

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年4月5日 (05.04.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/23556 A1

- (51)国際特許分類: C12N 15/12, 1/21, 5/10, C07K 14/715, 16/28, C12P 21/02, G01N 33/567 (72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 前田正嗣
(MAEDA, Masatsugu) [JP/JP]. 矢口紀子 (YAGUCHI, Noriko) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社中外分子医学研究所内 Ibaraki (JP).
- (21)国際出願番号: PCT/JP00/06654 (74)代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (22)国際出願日: 2000年9月27日 (27.09.2000) (81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25)国際出願の言語: 日本語 (84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:
特願平11/273358 1999年9月27日 (27.09.1999) JP
特願2000/240397 2000年8月3日 (03.08.2000) JP
- (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社
中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.) [JP/JP];
〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki (JP).

[続葉有]

(54) Title: NOVEL HEMOPOIETIN RECEPTOR PROTEIN, NR12

(54)発明の名称: 新規ヘモポエチン受容体蛋白質、NR12

(57) Abstract: A novel hemopoietin receptor gene (NR12) is successfully isolated by extracting a conserved motif from the amino acid sequence of a known hemopoietin receptor and presuming a sequence. NR12 involves two types, i.e., a transmembrane type and a soluble type. The expression of the NR12 gene is detected in tissues containing hematopoietic cells. NR12, which is a novel hemopoietin receptor molecule participating in biological immunomodulation and hematopoietic cell regulation, is useful in searching for a novel hematopoietic factor capable of functionally binding to this receptor and developing remedies for immune and hematopoietic diseases.

(57)要約:

既知のヘモポエチン受容体のアミノ酸配列から保存されているモチーフを抽出し、予測した配列をもとに新規なヘモポエチン受容体遺伝子(NR12)を単離することに成功した。NR12には細胞膜貫通型と可溶型の2つ型が存在していた。NR12遺伝子は造血系細胞を含む組織で発現が検出された。NR12は生体免疫調節、造血細胞調節に関する新規なヘモポエチン受容体分子であり、同受容体と機能結合し得る新規造血性因子の検索や、免疫・造血系関連疾患の治療薬の開発に有用である。

WO 01/23556 A1



AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:
— 国際調査報告書

明細書

新規ヘモポエチン受容体蛋白質、N R 1 2

技術分野

本発明は新規ヘモポエチン受容体蛋白質、それをコードする遺伝子、それらの製造方法及び用途に関する。

背景技術

種々の細胞の増殖や分化の制御、或いは分化成熟した細胞の機能維持、及び賦活化、さらには細胞死に至るまでを司る体液性因子として、これまでに数多くのサイトカインの存在が知られている。これらのサイトカインにはそれぞれ特異的な受容体が存在し、これらの受容体は構造上の類似性から幾つかのファミリーに分類されている(Hilton D.J., in "Guidebook to Cytokines and Their Receptors" edited by Nicola N.A. (A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press), 1994, p8-16)。

一方受容体間の類似性と比較するとサイトカイン同士の一次構造上の相同性は低く、同一の受容体ファミリーに属するサイトカインメンバーの間でさえ、アミノ酸レベルでの顕著な相同性は認められない。このことは個々のサイトカインの機能特異性を説明すると同時に、個々のサイトカインによって誘導される細胞応答の類似性を説明する。

上記サイトカイン受容体ファミリーの代表的なものとして、チロシンキナーゼ受容体、ヘモポエチン受容体、腫瘍壞死因子(TNF)受容体、トランスフォーミング増殖因子(TGF)受容体の各ファミリーが挙げられ、それぞれのファミリーで異なるシグナル伝達系の関与が報告されている。これらの受容体ファミリーのうち、特にヘモポエチン受容体ファミリーの多くは血液細胞あるいは免疫担当細胞に発現

しており、そのリガンドであるサイトカインはしばしば造血因子あるいはインターロイキンと称される。これら造血因子、あるいはインターロイキン類のあるものは生体血中に存在し全身的な造血あるいは免疫機能の体液性調節に関与していると考えられる。

このことは他の受容体ファミリーに対応するサイトカインが、しばしば局所での調節にのみ関与していると考えられる点とは対照的で、これらヘモポエチン類の一部のものはホルモン様因子として捉える事が可能である。また、逆に代表的なペプチド性ホルモンである成長ホルモン、プロラクチン、或いはレブチンの受容体もヘモポエチン受容体ファミリーに属する。上記ホルモン様の全身性調節様態から、これらのヘモポエチン類を投与することによる種々の疾患の治療への応用が期待される。事実、数多いサイトカイン類の中で臨床応用が行われているのは、エリスロポエチン、G-CSF、GM-CSF、IL-2であり、また現在臨床応用に向けた検討が行われている、IL-11、LIF、IL-12に加えて上記ペプチドホルモン類の成長ホルモン、プロラクチンを併せて考えると、前述の各種サイトカイン受容体スーパーファミリーのうち、ヘモポエチン受容体ファミリーに結合する新規サイトカインを探索する事により、より高い確率で臨床応用可能なサイトカインを見出すことが可能と考えられる。

上に述べた様にサイトカイン受容体はファミリーメンバー間で構造上の類似性を有している。この類似性を利用して新規受容体を発見する試みは数多く行われており、特にチロシンキナーゼ受容体に関しては、その触媒部位に高度に保存された配列を利用して、既に数多くの受容体がクローニングされている (Matthews W. et al., Cell (UNITED STATES), 1991, 65 (7) p1143-52)。これに対してヘモポエチン受容体はその細胞質領域にチロシンキナーゼの様な酵素活性ドメインを有しておらず、そのシグナル伝達は細胞質中に遊離状態で存在する、別のチロシンキナーゼ蛋白との会合を介して行われる事が知られている。JAKキナーゼ群と称される、これら細胞質性チロシンキナーゼとの受容体上の結合部位はファミリ

一メンバー間で一応保存されてはいるものの、その相同意はあまり高くない(Murakami M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1991, 88, p11349-11353)。一方これらへモポエチン受容体を最もよく特徴付ける配列は、むしろ細胞外領域に存在し、特にTrp-Ser-Xaa-Trp-Ser (Xaaは任意のアミノ酸) の5アミノ酸から成るモチーフは、殆ど全てのヘモポエチン受容体に保存されている。従って、このモチーフ配列を利用した、新規ファミリーメンバーの探索により、新規ヘモポエチン受容体遺伝子を単離することが期待される。事実これまでにIL-11受容体(Robb, L. et al., J. Biol. Chem. 271 (23); 1996, 13754-13761)、レブチン受容体(Gainsford T. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1996, 93 (25) p14564-8)及びIL-13受容体(Hilton D.J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1996, 93 (1) p497-501)などが、本アプローチにより同定されている。

発明の開示

本発明は、新規ヘモポエチン受容体蛋白質、およびそれらをコードするDNAを提供する。本発明はまた、該DNAが挿入されたベクター、該DNAを保持する形質転換体、および該形質転換体を利用した組換え蛋白質の製造方法を提供する。本発明はさらに、該蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明者らは、これまでに、Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフ(WSモチーフ)をコードするオリゴヌクレオチドをプローブに用いたブラークハイブリダイゼーション法や、あるいはRT-PCR等の方法により新規受容体の探索を試行してきた。ところが、このモチーフをコードするオリゴヌクレオチドtggag(t/c)nnntggag(t/c) (nは任意の塩基) が15塩基対と短いため、通常より低いアニーリング温度が要求される。逆に上記配列はg/c含量率が高いため、通常より高いアニーリング温度でなければ、厳密に15塩基が完全にハイブリダイズしたものだけを選別することは難しい。このような理由により通常のハイブリダイゼーションの実験条件下で、

スクリーニングを展開することは極めて困難であった。

これらの問題を解決するために、上記WSモチーフ以外の部位において、ヘモポエチン受容体ファミリーに保存されているモチーフを検討した。その結果、同ファミリーの細胞外領域においてWSモチーフより13～27アミノ酸上流に位置するチロシン残基、あるいはヒスチジン残基が高い確率で保存されており、さらに、そのTyr/His残基からC末端方向の6アミノ酸において、高頻度に出現するコンセンサス配列を検討した結果、(Tyr/His)-Xaa-(Hydrophobic/Ala)-(Gln/Arg)-Hydrophobic-Argといったアミノ酸配列（以下YRモチーフと称する）を見出すことが可能であった。しかしながら、このYRモチーフは必ずしも完全なコンセンサス配列と断定できるものではなく、また、このモチーフをコードする塩基配列の組み合わせは複雑性に富んでいる。従って、現実的なスクリーニングの手段となるハイブリダイゼーションのためのプローブや、あるいはRT-PCRを目的とするプライマーとして、このアミノ酸配列の全てをコード可能なオリゴヌクレオチドを合成、且つ供することは事実上不可能に近い。

そこで、上記2種類のモチーフをプローブとして利用する具体的な新規ヘモポエチン受容体ファミリーメンバーの検索手段を検討した結果、双方のモチーフ配列を共に含むように、既知ヘモポエチン受容体を断片化した部分アミノ酸配列を質問式(query)として用いる、コンピュータ上でのデータベース検索が、妥当であると判断した。実際にGenBankのhtgsデータベースに対するTBlastN検索を、複数の既知ヘモポエチン受容体の部分アミノ酸配列を質問式(query)として用いて繰り返し実施した結果、何れの場合においても、既知ヘモポエチン受容体を含む、多数の陽性クローンが得られた。次に上記検索で得られたクローンについて、高確率で陽性を示した配列周辺の塩基配列をアミノ酸配列に変換して既知のヘモポエチン受容体のアミノ酸配列と比較する、BlastX検索により、同受容体ファミリーメンバーをコードすると考えられる遺伝子を選別した。以上の二段階Blast検索のアプローチにより、最終的に2クローンの既知ヘモポエチン受容体と、1クロ

ーンの新規ヘモボエチン受容体遺伝子をコードするヒトゲノム配列を同定した。

次に、得られた塩基配列から予測可能であったエキソン部位配列をもとに、特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。これらプライマーを利用した5'-RACE法、及び3'-RACE法をヒト胎児肝臓、及び成人胸腺と成人精巣cDNAライブラリーを鋳型としておこなうことにより、NR12のN末端領域とC末端領域に対応するクローニングを各々取得した。そしてこれらクローニングの塩基配列を各々決定し、重複する中央部位にて両者を連結することにより完全長cDNAの全塩基配列を明らかにした。

構造解析の結果、スプライシング変異体に由来する、少なくとも3種の転写産物の相違が認められた。それら、スプライシング変異体のうち337アミノ酸からなる、細胞分泌型の可溶性受容体蛋白をコード可能であったcDNAクローニングをNR12.1とし、他方NR12.2及びNR12.3は、それぞれ428アミノ酸と629アミノ酸からなる、細胞膜貫通型の受容体蛋白をコード可能であった。これら、単離されたNR12全てのcDNAクローニングの一次構造に共通して、細胞外領域に他のファミリーメンバー間で保存されているシステイン残基の繰り返し構造や、YRモチーフ、及びWSモチーフ等が、よく保存されており典型的なヘモボエチン受容体をコードしていると考えられた。

その後、さらに、NR12.1、NR12.2及びNR12.3に特異的なプライマーセットを用いたRT-PCR解析法を、各ヒト臓器由来のmRNAに対しておこない、当該遺伝子の発現組織を検索すると共に、同遺伝子の各ヒト臓器における発現分布、及び、発現様態の解析をおこなった。RT-PCR法によって増幅された標的遺伝子は、これらクローニングに特異的なcDNA断片をプローブとして用いたサザンブロッティング法を実施することで、それが非特異的な増幅である可能性を否定すると同時に、RT-PCR産物の定量的評価をおこなった。その結果、これらクローニングの主たる産生組織は、造血担当細胞系組織、及び免疫担当細胞系組織であることを認めた。

さらに本発明者らは、ヒト胸腺cDNAライブラリーに対してPCRクローニングを実

施することにより、NR12.2、NR12.3に対して、それぞれ3アミノ酸異なる完全な蛋白質をコードする2つのクローン(NR12.4、NR12.5)を取得することに成功した(単離した5つのクローンを「NR12」と総称する)。

以上のようなNR12の特性から、NR12は生体免疫調節、或いは造血細胞調節に関する新規なヘモポエチン受容体分子と推定され、同受容体と機能結合し得る新規造血性因子の検索に、同遺伝子を利用するることは極めて有用であると考えられる。

さらに、本発明者らは、ヒトNR12のcDNAをプローブとした異種間交叉ハイブリダイゼーションクローニングをマウスゲノムDNAライブラリーに対して実施することにより、当該受容体のマウス相同ゲノム遺伝子断片を単離することに成功した。該マウス遺伝子断片を用いたNR12遺伝子欠損マウスの作製によって、当該受容体蛋白質の生体機能のさらなる解明が期待される。

すなわち、本発明は、新規なヘモポエチン受容体およびそれらの遺伝子、ならびにそれらの利用に関し、より具体的には、

- (1) 下記(a)から(d)のいずれかに記載のDNA、
 - (a) 配列番号：2、4、6、8、または10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、
 - (b) 配列番号：1、3、5、7、または9のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、
 - (c) 配列番号：2、4、6、8、または10のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2、4、6、8、または10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA、
 - (d) 配列番号：1、3、5、7、または9のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：2、4、6、8、または10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等

な蛋白質をコードするDNA、

(2) 配列番号：2、4、6、8、または10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA、

(3) (1)または(2)に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド、

(4) (1)または(2)に記載のDNAが挿入されたベクター、

(5) (1)または(2)に記載のDNAまたは(4)に記載のベクターを保持する形質転換体、

(6) (5)に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質を回収する工程を含む、(3)に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (3)に記載の蛋白質に結合する抗体、

(8) 配列番号：1、3、5、7、または9のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、

(9) (3)に記載の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、を提供するものである。

本発明は、新規ヘモボエチン受容体「NR12」を提供する。GenBankデータベース解析、および5'-RACE及び3'-RACEによる解析の結果から、本発明者らは新規ヘモボエチン受容体遺伝子NR12を同定し単離することに成功した。NR12の転写産物には、少なくとも3種のスプライス変異体の存在が確認された。このうち、可溶性受容体様蛋白をコードするcDNAクローンをNR12.1とした。他方、細胞膜貫通型受

容体蛋白をコードすると考えられるcDNAクローンのうち、51アミノ酸の短い細胞内領域を持つと予想される蛋白質をコードするクローンをNR12.2、そして、252アミノ酸の長い細胞内領域を持つと予想される蛋白質をコードするクローンをNR12.3と命名した。

さらに、本発明者らは、ヒト胸腺cDNAライブラリーに対してPCRクローニングを実施し、連続する完全長コーディング配列(CDS)の再単離を行った。このうち、NR12.2とほぼ同一の完全長ORFを有するクローンをNR12.4と命名し、NR12.3とほぼ同一の完全長ORFを有するクローンをNR12.5と命名した。

NR12.1 cDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。また、NR12.2 cDNAの塩基配列を配列番号：3に、該cDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：4に示す。また、NR12.3 cDNAの塩基配列を配列番号：5に、該cDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：6に示す。さらに、NR12.4 cDNAの塩基配列を配列番号：7に、該cDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：8に示し、NR12.5 cDNAの塩基配列を配列番号：9に、該cDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：10に示した。

細胞外領域においては、NR12.1、NR12.2、NR12.3、NR12.4、NR12.5共にほぼ同一であるため、これらは同様の立体構造を保有し、さらに同一の特異的リガンドを認識すると考えられる。

RT-PCR法を用いて各ヒト臓器における遺伝子発現解析を実施した結果、成人脾臓、胸腺、リンパ節、骨髓、末梢白血球などの造血担当細胞系組織、及び免疫担当細胞系組織においてNR12の強い遺伝子発現を認め、さらに精巣、肝臓、肺、腎臓、脾臓や、小腸、結腸の消化管においても、その発現を検出した。また、解析をおこなった全てのヒト胎児臓器由来のmRNAにおいても、その遺伝子発現を認めた。これらNR12の遺伝子発現分布を総合すると、主に免疫担当細胞系組織、及び造血細胞を含むと考えられる組織に強い発現の局在が検出されたことより、NR12

は新規造血因子受容体をコードするものと推定される。また、上記以外の組織においても発現分布が認められたことは、NR12が免疫系及び造血系のみならず、多岐にわたる生体内の生理機能を調節し得る可能性をも示唆している。

上記NR12蛋白質には、医療への応用が考えられる。NR12.1が胸腺、末梢白血球及び脾臓に発現していることから未知の造血因子の受容体である可能性が示唆される。従って、NR12蛋白質はこの未知の造血因子を得るために有用な材料を提供するものと考えられる。また、NR12分子と機能結合し得るアゴニスト、或いはアンタゴニストの検索を、ペプチドライブラー、または合成化学材料に対しておこない、単離同定することも考えられる。さらに、NR12分子に機能結合する新規分子、及びNR12分子機能を制限し得る特異的抗体の検索による、生体免疫応答制御や造血細胞制御といった臨床応用が期待される。

また、NR12の発現はこれら造血組織中の限られた細胞集団に特異的に発現している可能性が想定され、この細胞集団を分離する手段として抗NR12抗体は有用である。この様にして分離された細胞集団は細胞移植療法への応用が可能である。さらに抗NR12抗体は白血病を初めとした疾患の病型診断あるいは治療への応用も期待される。

一方、NR12蛋白質の細胞外ドメインを含む可溶性蛋白質、あるいはNR12のスプライス変異体であるNR12.1はデコイ型受容体としてNR12リガンドの阻害剤としての利用が想定され、NR12が関与する白血病を初めとする疾患の治療への応用が期待できる。

本発明は、NR12蛋白質と機能的に同等な蛋白質を包含する。このような蛋白質には、例えば、ヒトNR12蛋白質に対応する他の生物のホモログ蛋白質やヒトNR12蛋白質の変異体が含まれる。本発明において「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質が、上記NR12蛋白質と同等の生物学的活性を有することを指す。生物学的活性としては、例えば、膜結合型または可溶型の造血因子受容体蛋白質活性である。

ある蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための、当業者によく知られた方法としては、蛋白質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel, TA(1985) Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492、Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766)などを用いて、ヒトNR12蛋白質のアミノ酸に適宜変異を導入することによりヒトNR12蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、ヒトNR12蛋白質のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、ヒトNR12蛋白質と機能的に同等な蛋白質もまた本発明の蛋白質に含まれる。

本発明のNR12蛋白質と機能的に同等な蛋白質としては、具体的には、配列番号：2、4、6、8、または10に示されるアミノ酸配列中の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が欠失したもの、配列番号：2、4、6、8、または10に示されるアミノ酸配列に1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が付加したもの、配列番号：2、4、6、8、または10に示されるアミノ酸配列中の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものが挙げられる。

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C、

M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字表記を表す)。

なお、あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666, Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500, Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433, Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

ヒトNR12蛋白質のアミノ酸配列(配列番号: 2、4、6、8、または10)に1又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質としては、例えば、ヒトNR12蛋白質を含む融合蛋白質が挙げられる。融合蛋白質は、ヒトNR12蛋白質と他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり、本発明に含まれる。融合蛋白質を作製する方法は、本発明のヒトNR12蛋白質をコードするDNAと他のペプチド又は蛋白質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質としては、特に限定されない。

本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチドとしては、例えば、FLAG (Ho pp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis(ヒスチジン)残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 α -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明の蛋白質との融合に付される他の蛋白質としては、例えば、GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA(インフ

ルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP(マルトース結合蛋白質)等が挙げられる。

市販されているこれらペプチドまたは蛋白質をコードするDNAを本発明の蛋白質をコードするDNAと融合させ、これにより調製された融合DNAを発現させることにより、融合蛋白質を調製することができる。

また、ある蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術(Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ヒトNR12蛋白質をコードするDNA配列(配列番号: 1、3、5、7、または9)もしくはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAからヒトNR12蛋白質と機能的に同等な蛋白質を単離することも通常行いうことである。このように、ヒトNR12蛋白質をコードするDNAもしくはその一部からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、ヒトNR12蛋白質と機能的に同等な蛋白質もまた本発明の蛋白質に含まれる。このような蛋白質としては、例えば、ヒト以外の哺乳動物のホモログ(例えば、サル、マウス、ラット、ウサギ、ウシの遺伝子がコードする蛋白質)が挙げられる。ヒトNR12蛋白質をコードするDNAと相同性の高いcDNAを、動物から単離する場合、特に脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄、末梢白血球などの造血担当細胞系組織、及び免疫担当細胞系組織を用いることが好ましいと考えられるが、それらの臓器に限定されない。

ヒトNR12蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件としては、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば、低ストリンジエントな条件が挙げられる。低ストリンジエントの条件とは、例えば42°C、2×SSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50°C、2×SSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジエントな条件が挙げられる。高ストリンジエントな条件とは、例えば65°C、

2×SSC及び0.1%SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を下げる程に高い相同性を有するDNAのみならず、低い相同性しか有していないDNAまでも包括的に得ることができる。逆に、温度を上げる程、高い相同性を有するDNAのみを得られることができが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度以外にも塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

また、ハイブリダイゼーションにかえて、ヒトNR12蛋白質をコードするDNA（配列番号：1、3、5、7、または9）の配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子增幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を利用して目的のDNAを単離することも可能である。

これらハイブリダイゼーション技術または遺伝子增幅技術により単離されるDNAがコードするヒトNR12蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、通常、ヒトNR12蛋白質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明の蛋白質には、ヒトNR12蛋白質と機能的に同等であり、かつ配列番号：2、4、6、8、または10に示されるアミノ酸配列と高い相同性を有する蛋白質も含まれる。高い相同性とは、通常、70%以上の相同性、好ましくは80%以上の相同性、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。蛋白質の相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

本発明の蛋白質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られた蛋白質が、本発明のヒトNR12蛋白質（配列番号：2、4、6、8、または10）と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の蛋白質を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の蛋白質のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。また、真核細胞、例えば

哺乳動物細胞で発現させた場合、N末端のシグナル配列は除去される。本発明の蛋白質はこのような蛋白質も包含する。

例えば、文献 (Von Heijne, G. Nucleic Acids Research (1986) 14, 4683-4690) に記載の方法に基づいて、本発明の蛋白質を解析した結果、シグナル配列は配列番号：2、4、6、8、および10のアミノ酸配列において、1位のMetから23位のGlyまでと推定された。したがって、本発明は配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、24位のGlyから337位のCysまでからなる蛋白質を包含する。同様に、配列番号：4に記載のアミノ酸配列において、24位のGlyから428位のSerまでからなる蛋白質を包含する。同様に、配列番号：6に記載のアミノ酸配列において、24位のGlyから629位のLysまでからなる蛋白質を包含する。同様に、配列番号：8に記載のアミノ酸配列において、24位のGlyから428位のSerまでからなる蛋白質を包含する。同様に、配列番号：10に記載のアミノ酸配列において、24位のGlyから629位のLysまでからなる蛋白質を包含する。

本発明の蛋白質は、当業者に公知の方法により、組み換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組み換え蛋白質であれば、本発明の蛋白質をコードするDNA(例えば配列番号：1、3、5、7、または9に記載の塩基配列を有するDNA)を、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲルfiltrationなどのクロマトグラフィー、あるいは本発明の蛋白質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティーコロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。

また、本発明の蛋白質をグルタチオンSトランスフェラーゼ蛋白質との融合蛋白質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換え蛋白質として宿主細胞(例えば、動物細胞や大腸菌など)内で発現させた場合には、発現させた組み換え蛋白質はグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することが

できる。

融合蛋白質の精製後、必要に応じて融合蛋白質のうち目的の蛋白質以外の領域を、トロンビンまたはファクターXaなどにより切断し、除去することも可能である。

天然の蛋白質であれば、当業者に周知の方法、例えば、本発明の蛋白質を発現している組織や細胞の抽出物に対し、後述するNR12蛋白質に結合する抗体が結合したアフィニティーカラムを作用させて精製することにより単離することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを包含する。本発明の蛋白質に特異的なアミノ酸配列からなる部分ペプチドは、少なくとも7アミノ酸、好ましくは8アミノ酸以上、さらに好ましくは9アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、例えば、本発明の蛋白質に対する抗体の作製、本発明の蛋白質に結合する化合物のスクリーニングや、本発明の蛋白質の促進剤や阻害剤のスクリーニングに利用し得る。また、本発明の蛋白質のリガンドに対するアンタゴニストになり得る。本発明の蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、配列番号：2、4、6、8、または10に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の活性中心からなる部分ペプチドが挙げられる。また、疎水性プロット解析から推定される疎水性領域や親水性領域の1つあるいは複数の領域を含む部分ペプチドが挙げられる。これらの部分ペプチドは1つの疎水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよいし、1つの親水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよい。また、例えば、本発明の蛋白質の可溶型蛋白質や細胞外領域からなる蛋白質も本発明に包含される。

本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

また、本発明は、本発明の蛋白質をコードするDNAを提供する。本発明のDNAは、上述したような本発明の蛋白質の *in vivo* や *in vitro* における生産に利用される他、例えば、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患の遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明のDNAは、本発明の蛋白質をコードしうるものであれば、いかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

本発明のDNAは、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明の蛋白質を発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1、3、5、7、または9）の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNAライブラリーは、例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。また、本発明の蛋白質を発現している細胞よりRNAを調製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1、3、5、7、または9）に基づいてオリゴDNAを合成し、これをプライマーとして用いてPCR反応を行い、本発明の蛋白質をコードするcDNAを增幅させることにより調製することも可能である。

また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明の蛋白質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られたcDNAをプローブとしてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノムDNAを単離することができる。

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明の蛋白質を発現する細胞、組織、臓器（例えば脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄、末梢白血球などの造血担当細胞系組織、及び免疫担当細胞系組織など）から、mRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemis

try (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業) 等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプライマー等を用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製) およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) にしたがい、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認することができる。

また、本発明のDNAにおいては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い塩基配列を設計することができる(Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-74)。また、本発明のDNAは、市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンクーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終止コドン (TAA、TGA、又はTAG) の挿入等が挙げられる。

本発明のDNAは、具体的には、配列番号：1の塩基配列において98位の塩基Aか

ら1108位の塩基CからなるDNA、配列番号：3の塩基配列において98位の塩基Aから1381位の塩基CからなるDNA、配列番号：5の塩基配列において98位の塩基Aから1984位の塩基GからなるDNA、配列番号：7の塩基配列において1位の塩基Aから1284位の塩基CからなるDNA、および配列番号：9の塩基配列において1位の塩基Aから1887位の塩基GからなるDNAを包含する。

本発明のDNAはまた、配列番号：1、3、5、7、または9に示す塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ上記本発明の蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを含む。

ストリンジエントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジエントな条件が挙げられる。低ストリンジエントの条件とは、例えば42°C、2×SSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50°C、2×SSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジエントな条件が挙げられる。高ストリンジエントな条件とは、例えば65°C、2×SSC及び0.1%SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同意を有するDNAを得ることができる。上記のハイブリダイズするDNAは好ましくは天然由来のDNA、例えばcDNA又は染色体DNAであってよい。

また、本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明のDNAを保持したり、本発明の蛋白質を発現させるために有用である。

ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンビシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブク

ローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター (Wardら, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーター (Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043.)、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1 (Pharmacia社製)、「QI Aexpress system」 (Qiagen社製)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに產生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外にも、例えば、本発明の蛋白質を製造するために用いられるベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター [例えば、pcDNA3 (Invitrogen社製) や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322)、pEF、pCDM8]、昆虫細胞由来の発現ベクター [例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」 (GIBCO BRL社製)、pBacPAK8]、植物由来の発現ベクター [例えばpMH1、pMH2]、動物ウイルス由来の発現ベクター [例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw]、レトロウイルス由来の発現ベクター [例えば、pZIpneo]、酵母由来の発現ベクター [例えば、「Pichia Expression Kit」 (In vitrogen社製)、pNV11、SP-Q01]、枯草菌由来の発現ベクター [例えば、pPL608、pKTH50] などが挙げられる。

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター (Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子(例えば、薬剤(ネオマイシン、G418など)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター(例えば、pCHOIなど)を導入し、メトトレキセート(MTX)により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター(pcdなど)で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシバビロマウイルス(BPV)等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、大腸菌キサンチングアミニホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子等を含むことができる。

一方、動物の生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、レトロウイルス法、リボソーム法、カチオニックリボソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。これにより、本発明のNR12遺伝子の変異に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター(例えばpAdexlcw)やレトロウイルスベクター(例えばpZIPneo)などが

挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning, 5.61-5.63)。生体内への投与は、*ex vivo*法であっても、*in vivo*法であってもよい。

また、本発明は、本発明のDNAまたはベクターが導入された形質転換体を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明の蛋白質の製造や発現のための産生系として使用することができる。蛋白質製造のための産生系は、*in vitro*および*in vivo*の産生系がある。*in vitro*の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdh fr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバコ (Nicotiana tabacum) 由來の細胞が蛋白質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サ

ツカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる產生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6~8であるのが好ましい。培養は、通常、約30~40°Cで約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、*in vivo* で蛋白質を產生させる系としては、例えば、動物を使用する產生系や植物を使用する產生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内で蛋白質を產生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる產生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とするDNAを、ヤギβカゼインのような乳汁中に固有に產生される蛋白質をコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が产生する乳汁から、目的の蛋白質を得ることができる。トランスジェニックヤギから產生される蛋白

質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の蛋白質をコードするDNAを挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的の蛋白質を得ることができる (Susu mu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする蛋白質をコードするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agr obacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

これにより得られた本発明の蛋白質は、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一な蛋白質として精製することができる。蛋白質の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば蛋白質を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティーコロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の

液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された蛋白質も包含する。

なお、蛋白質を精製前又は精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシリエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

また、本発明は、本発明の蛋白質と結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどの免疫動物に本発明の蛋白質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

抗体取得の感作抗原として使用される本発明の蛋白質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来の蛋白質が好ましく、特にヒト由来の蛋白質が好ましい。ヒト由来の蛋白質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

本発明において、感作抗原として使用される蛋白質は、完全な蛋白質であってもよいし、また、蛋白質の部分ペプチドであってもよい。蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、蛋白質のアミノ基(N)末端断片やカルボキシ(C)末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とは蛋白質の全長又は断片に反応する抗体を意味する。

本発明の蛋白質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターで本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該宿主細胞内外から目的の蛋白質又はその断片を公知の方法で得て、これらを感作抗原として用いればよい。また、蛋白質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明の蛋白質を感作抗原として使用してもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細

胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、靈長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。靈長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル(旧世界ザル)、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釀、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4~21日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適當な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

ここで、本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。例えば、本発明の蛋白質をカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、本発明の蛋白質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調製することができる。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、

細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日・数週間継続して行う。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroで蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、蛋白質への結合活性を有する所望のヒト抗体を產生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688号公報）。

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明の蛋白質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明の蛋白質の精製、検出に用いられる他、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を本発明の蛋白質が関与する疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体

を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照）。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（oncogene）により不死化させた細胞を用いてよい。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて產生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., *THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES*, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

さらに、本発明の抗体は、本発明の蛋白質に結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')²、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェインFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 1

21, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も含まれる。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR(相補性決定領域)とヒト抗体由来のFR(フレームワーク領域)及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティーコロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる(Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)等により行うことができる。

アフィニティーコロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。

アフィニティーコロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆

相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明の蛋白質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニル磷酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。蛋白質として蛋白質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製)を使用することができる。

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明の蛋白質の検出又は測定方法を実施することができる。

本発明の蛋白質の検出又は測定方法は、蛋白質を特異的に検出又は測定することができるため、蛋白質を用いた種々の実験等に有用である。

本発明はまた、ヒトNR12蛋白質をコードするDNA(配列番号：1、3、5、7、または9)またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

ここで「相補鎖」とは、A:T、G:Cの塩基対からなる2本鎖ポリヌクレオチドの一

方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

このようなポリヌクレオチドには、本発明の蛋白質をコードするDNAの検出や増幅に用いるプローブやプライマー、本発明の蛋白質の発現を抑制するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。また、このようなポリヌクレオチドは、DNAチップの作製に利用することもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：1、3、5、7、または9の塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1、3、5、7、または9の塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補配列であるものののみならず、DNAまたはmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1、3、5、7、または9に示される塩基配列に特異的にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明の蛋白質の產生細胞に作用して、該蛋白質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明の蛋白質の発現を抑制することにより、結果的に本発明の蛋白質の作用を抑制する効果を有する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1～100mg/kg、好ましくは0.1～50mg/kgの範囲で投与することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明の蛋白質の発現を阻害し、従って本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

本発明の蛋白質は、これに結合する化合物のスクリーニングに有用である。すなわち、本発明の蛋白質と、該蛋白質に結合する化合物を含むと予想される被験試料とを接触せしめ、本発明の蛋白質と被験試料との結合活性を検出し、そして本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する、ことからなる本発明

の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法において使用される。

スクリーニングに用いられる本発明の蛋白質は組換え蛋白質であっても、天然由来の蛋白質であってもよい。また部分ペプチドであってもよい。また細胞表面に発現させた形態、または膜画分としての形態であってもよい。被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製蛋白質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させる本発明の蛋白質は、例えば、精製した蛋白質として、可溶型蛋白質として、担体に結合させた形態として、他の蛋白質との融合蛋白質として、細胞膜上に発現させた形態として、また、膜画分として被検試料に接触させることができる。

本発明の蛋白質を用いて、例えば該蛋白質に結合する蛋白質（リガンド等）をスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明の蛋白質をコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA I, pCD8などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1 α promoter (Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p. 684-704 (1987)), SR α promoter (Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。

動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAEデキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985))、リボフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位(エピトープ)を本発明の蛋白質のN末またはC末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合蛋白質として本発明の蛋白質を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体体系としては市販されているものを利用することができる(実験医学 13, 85-90 (1995))。マルチクローニングサイトを介して、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光蛋白質(GFP)などとの融合蛋白質を発現することができるベクターが市販されている。

融合蛋白質にすることにより本発明の蛋白質の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合蛋白質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン(His-tag)、インフルエンザ凝集素HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitisウイルス糖蛋白質(VSV-GP)、T7 gene10蛋白質(T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質(HSV-tag)、E-tag(モノクローナルファージ上のエピトープ)などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明の蛋白質に結合する蛋白質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体体系として利用できる(実験医学 13, 85-90 (1995))。

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した

細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明の蛋白質、それと結合能を有する蛋白質、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明の蛋白質に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明の蛋白質に対する抗体は、例えば、本発明の蛋白質をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させた蛋白質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

免疫複合体は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、Protein A Sepharose や Protein G Sepharose を用いて沈降させることができる。また、本発明の蛋白質を、例えば、GSTなどのエピトープとの融合蛋白質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4Bなどのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明の蛋白質の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができるもの。

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献 (Harlow, E. and Lane, D.: *Antibodies*, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)) 記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

免疫沈降された蛋白質の解析には SDS-PAGE が一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることで蛋白質の分子量により結合していた蛋白質を解析することができる。また、この際、一般的には本発明の蛋白質に結合した蛋白質は、クマシ染色や銀染色といった蛋白質の通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である ^{35}S -メチオニンや ^{35}S -システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内の蛋白質を標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。蛋白質の分子量が判明すれば直接 SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的の蛋白質を精製し、その配列を決定することもできる。

また、本発明の蛋白質を用いた、これに結合する蛋白質の単離は、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うことができる。すなわち、本発明の蛋白質と結合する結合蛋白質を発現していることが予想される細胞、組織、臓器よりファージベクター (λ gt11, ZAPなど) を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させた蛋白質を固定し、精製して標識した本発明の蛋白質と上記フィルターとを反応させ、本発明の蛋白質と結合した蛋白質を発現するブラークを標識により検出すればよい。本発明の蛋白質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明の蛋白質又は本発明の蛋白質に融合したペプチド又はポリペプチド(例えばGSTなど)に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた2-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292, Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612、「MATCHMAKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれもClontech社製)、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(Stratagene社製))を用いて行う方法が挙げられる。2-ハイブリッドシステムにおいては、本発明の蛋白質をSRF DNA結合領域またはGAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローニングからライブラリー由来cDNAを単離する(酵母細胞内で本発明の蛋白質と結合する蛋白質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクロ

ーンが確認できる）。単離したcDNAを大腸菌に導入して発現させることにより、該cDNAがコードする蛋白質を得ることができる。これにより本発明の蛋白質に結合する蛋白質またはその遺伝子を調製することが可能である。2-ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。

本発明の蛋白質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティーコロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、本発明の蛋白質をアフィニティーカラムの担体に固定し、ここに本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明の蛋白質に結合した蛋白質を調製することができる。

得られた蛋白質は、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該蛋白質をコードするDNAを得ることができる。

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは本発明の蛋白質と被検化合物との間の相互作用を微量の蛋白質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore、Pharmacia製）。したがって、BIAcore等のバイオセンサーを用いることにより本発明の蛋白質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

また、蛋白質に限らず、本発明の蛋白質に結合する化合物（アゴニスト、およびアンタゴニストを含む）を単離する方法としては、例えば、固定した本発明の蛋白質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディ

スプレライブラリーを作用させ、本発明の蛋白質に結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法 (Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9) が当業者に公知である。

また、本発明蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングは、本発明蛋白質の細胞外ドメインと既知のシグナル伝達能を有するヘモポエチン受容体蛋白質の細胞膜貫通ドメインを含む細胞内ドメインとを連結せしめて作製したキメラ受容体を、適当な細胞株、好ましくは適当な増殖因子の存在下でのみ生存および増殖可能な細胞株（増殖因子依存性細胞株）の細胞表面に発現せしめた後、該細胞株を種々の増殖因子、サイトカイン、または造血因子等を含むことが期待される材料を添加して培養することにより実施可能である。この方法は、被検材料中に本発明蛋白質の細胞外ドメインと特異的に結合するリガンドが存在する場合にのみ、上記増殖因子依存性細胞株が生存および増殖が可能であることを利用している。既知のヘモポエチン受容体としては、例えば、トロンボポエチン受容体、エリスロポエチン受容体、G-CSF受容体、gp130等が挙げられるが、本発明のスクリーニング系に用いるキメラ受容体のパートナーは、これら既知のヘモポエチン受容体に限定されるものではなく、細胞質ドメインにシグナル伝達活性に必要な構造を備えているものであれば何を用いても構わない。増殖因子依存性細胞株としては、例えば、BaF3やFDC-P1を初めとしたIL3依存性細胞株を利用することが可能である。

本発明の蛋白質と特異的に結合するリガンドとしては、希ではあるが可溶性蛋白質ではなく細胞膜結合型蛋白質である可能性も想定される。この様な場合には

むしろ本発明の蛋白質の細胞外ドメインのみを含む蛋白質あるいは当該細胞外ドメインに他の可溶性蛋白質の部分配列を付加した融合蛋白質を標識後、リガンドを発現していることが期待される細胞との結合を測定することによりスクリーニングすることが可能である。本発明の蛋白質の細胞外ドメインのみを含む蛋白質としては、例えば、細胞膜貫通ドメインのN端側に終止コドンを挿入することにより人為的に作成した可溶性受容体蛋白質、あるいはNR12-1等の可溶型蛋白質が利用可能である。一方、本発明の蛋白質の細胞外ドメインに他の可溶性蛋白質の部分配列を付加した融合蛋白質としては、例えば、免疫グロブリンのFc部位やFLAGペプチド等を細胞外ドメインのC端に付加して調製した蛋白質が利用可能である。これらの可溶性標識蛋白質は上述したウエストウエスタン法における検出にも利用可能である。

例えば、本発明の蛋白質の細胞外領域と抗体（例えばヒトIgG抗体）のFc領域とのキメラ蛋白質は、プロテインAカラム等を用いて精製することができる。このような抗体様キメラ蛋白質は、リガンドの結合活性を有することから、適宜、放射性同位元素等で標識した後、リガンドのスクリーニングに用いることができる（Suda, T. et al., Cell, 175, 1169-1178 (1993)）。また、TNFファミリー分子などのある種のサイトカインでは、その多くが膜結合型でも存在することから、各種の細胞と抗体様キメラ蛋白質を反応させて、結合活性を示した細胞から、リガンドを単離する事ができる可能性もある。また、cDNAライブラリーを導入した細胞を用いて同様にリガンドを単離することができる。さらに、抗体様キメラ蛋白質をアンタゴニストとして用いることも可能である。

スクリーニングにより単離され得る化合物は、本発明の蛋白質の活性を促進または阻害するための薬剤の候補となり、本発明の蛋白質の発現異常や機能異常などに起因する疾患の治療への応用が考えられる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニング方

法を用いて得られる化合物に含まれる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物や本発明の蛋白質（デコイ型（可溶性型））をヒトや動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適當な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターク、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イ

オニ性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM) 、HCO-50と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

例えば、本発明の蛋白質（デコイ型（可溶性型））の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約100 μ gから10～20mgであると考えられる。

例えば、本発明の蛋白質と結合する化合物や本発明の蛋白質の活性を阻害する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を

投与することができる。

図面の簡単な説明

図1は、htgsデータベース内に同定したAL109843の部分塩基配列を示す図である。予測可能であったエキソン配列の塩基配列を大文字で記し、そのアミノ酸配列も併記した。標的としたYRモチーフ配列、及びWSモチーフ配列のアミノ酸配列をそれぞれ枠で囲って示した。

図2は、AL109843配列内に見出したNR12の部分アミノ酸配列と相同性を示す、既知ヘモボエチン受容体の部分アミノ酸配列をそれぞれ併記した図である。一致するアミノ酸配列は枠付きで示し、また、類似性質を示すアミノ酸配列に影を施した。さらにギャップスペースはバーで補足した。上段から順に、ヒトgp130、ヒトNR9、ヒトProlactin受容体、ヒトIL-7受容体、及びヒトLIF受容体を記載した。

図3は、AL109843配列内に予測したWSエキソン上に設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いた5'-RACE法、及び3'-RACE法によって増幅された、PCR産物を示す写真である。特異的なPCR反応による増幅産物を矢印で示した。

図4は、5'-RACE、及び3'-RACEによって得られた産物を複合した、NR12.1の完全長cDNA の塩基配列を示した図である。NR12.1がコードするアミノ酸配列も併記した。また、分泌シグナル配列と予測されるアミノ酸配列に下線を施した。さらに、保存されたシステイン残基、及びYRモチーフとWSモチーフのアミノ酸配列を枠付きで示した。

図5は、5'-RACE、及び3'-RACEによって得られた産物を複合した、NR12.2の完全長cDNA の塩基配列を示した図である。NR12.2がコードするアミノ酸配列も併記した。また、分泌シグナル配列と予測されるアミノ酸配列に下線を施した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列は影付きで示した。細胞外領域の保存されたシステイン残基、及びYRモチーフとWSモチーフのアミノ酸配列を枠付きで示した。

図6は、5'-RACE、及び3'-RACEによって得られた産物を複合した、NR12.3の完全長cDNAの塩基配列を示した図である。NR12.3がコードするアミノ酸配列も併記した。また、分泌シグナル配列と予測されるアミノ酸配列に下線を施した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列は影付きで示した。細胞外領域の保存されたシステイン残基、及びYRモチーフとWSモチーフのアミノ酸配列を枠付きで示した。

図7は、図6の続きである。

図8は、RT-PCR法により各ヒト臓器における、NR12の遺伝子発現分布を解析した結果を示す写真である。NR12の特異的なPCR増幅産物のサイズを矢印で示した。

図9は、サザンブロッティングにより各ヒト臓器におけるNR12の遺伝子発現分布を定量解析した結果を示す写真である。検出したNR12の、特異的なシグナルのサイズを矢印で示した。

図10は、発現ベクターに構築した哺乳動物細胞にて発現可能なNR12融合蛋白質の構造模式図である。

図11は、NR12.4の完全長cDNAの塩基配列を示す図である。NR12.4がコードするアミノ酸配列も併記した。また、分泌シグナル配列と予測されるアミノ酸配列に下線を施した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に影塗りを施した。細胞外領域の保存されたシステイン残基、及びYRモチーフとWSモチーフのアミノ酸配列を太字で示した。

図12は、図11の続きである。

図13は、NR12.5の完全長cDNAの塩基配列を示した。NR12.5がコードするアミノ酸配列も併記した。また、分泌シグナル配列と予測されるアミノ酸配列に下線を施した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に影塗りを施した。細胞外領域の保存されたシステイン残基、及びYRモチーフとWSモチーフのアミノ酸配列を太字で示した。

図14は、図13の続きである。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例 1】 NR12遺伝子の単離

(1) TblastN検索による一次スクリーニング

各機関のヒトゲノム解析プロジェクトによって、精力的にヒトゲノム遺伝子配列の解読が推進されている昨今に至っても、既に解析が完了している配列は全ヒトゲノム配列のうち、未だ 10 %にさえも及んでいないのが現状である。しかしながら、標的遺伝子の検索、及び塩基配列の決定や遺伝子マッピングをおこなう場合、上記プロジェクト等によって現在までに提供された情報を利用することは、有効な手段選択肢のひとつに挙げられる。上記配列の情報基盤はバクテリア人工染色体 (Bacterial artifical chromosome; BAC) クローンや、酵母人工染色体 (Yeast artifical chromosome; YAC) クローンの整列化によって、膨大な情報規模を形成しながらも、将来的な完全データベース化が目指されている。本発明者らは公的データベースの 1 つである、GenBank の「High Throughput Genomic Sequence (htgs)」データベース中のBACクローン配列内に、新規ヘモポエチン受容体蛋白の一部をコードする、ヒトゲノム遺伝子を同定した。

前述のように本発明者らは、ヘモポエチン受容体ファミリーに保存されたモチーフ配列として、その細胞外領域に(Tyr/His)-Xaa-(Hydrophobic/Ala)-(Gln/Arg)-Hydrophobic-Argモチーフ(YRモチーフ)と、これより C末端側近傍に位置するTrp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフ(WSモチーフ)の両者を見出した。しかしながら、これら双方のモチーフ配列を包括的に含有するオリゴヌクレオチドプローブ配列を設計することは極めて困難であった。そこで、双方の配列を共に含むように、既知ヘモポエチン受容体を断片化した部分アミノ酸配列を質問式(query)として用い、

コンピュータ上でのデータベース検索をおこなった。既知ヘモポエチン受容体配列として、表1に示す各ヒト受容体を用い、それについて、質問式(query)として利用可能な部分アミノ酸配列の断片化を検討した。ここで、既知ヘモポエチン受容体のゲノム構造上、これらYRモチーフ、及びWSモチーフをコードするエキソン(WSエキソン)が、およそ50～70アミノ酸程度であることと、このエキソンよりさらにN末端側に隣接するエキソン(PPエキソン)も同様に50～70アミノ酸程度であることに着目し、便宜的にこれら双方のエキソンを含むように約120アミノ酸を切り取り質問式(query)配列とした。従って、質問式配列として用いた部分アミノ酸配列の長さは、それぞれの既知ヘモポエチン受容体によって異なるが、全ての質問式配列においてPPエキソンの開始点近傍に位置する1個乃至、複数のPro残基から、WSエキソン上のWSモチーフ終結後、10アミノ酸程度C末端側の配列までを含むように切り取ることで、構造的特徴は保存されている。

表にはデータベース検索の質問式として用いた既知ヘモポエチン受容体を列挙した。モチーフ配列において保存されたアミノ酸残基を、下線を付けた太字で示した。

(表1)

ヒト 受容体	GenBank アクセスション#	YR-モチーフ 配列	WS-モチーフ 配列
LIF-R	NM_002310	XTFRIR	WSKWS
gp130	NM_002184	YVFRIR	WSDWS
IL-12R β 1	NP_005526	QEFQLR	WSKWS
IL-12R β 2	NM_001559	YEFQIS	WSDWS
G-CSFR	NM_000760	XTLQIR	WSDWS
EPO-R	M34986	XTFAVR	WSAWS
TPO-R	M90103	XRLQLR	WSSWS
Leptin-R	U50748	XAVQVR	WSNWS
IL-3R α	M74782	XTVQIR	LSAWS
IL-4R	NM_000418	YRARVR	WSEWS
IL-5R α	M96651	XDVQVR	WSEWS
IL-6R	NM_000565	HVVQLR	WSEWS
IL-7R	NM_002185	YEIKVR	WSEWS
IL-11R α	U32324	HAVRVS	WSTWS
IL-13R α	NM_001560	NTVRIR	WSNWS
IL-2R β	A28052	YEFQVR	WSPWS
IL-2R γ	NM_000206	XTFRVR	WSEWS
GM-CSFR	M64445	HSVKIR	WSSWS
CNTF-R	NM_001842	XIIQVA	WSDWS
PRL-R	NM_000949	XLVQVR	WSANS
NR6(CRLF1)	NM_004750	YFVQVR	WSEWS
NR9(CREME9)	AF120151	XQFRVC	WSPWS

以上の配列を質問式とし、TblastN (Advanced TblastN 2.0.9)プログラムを用いた検索を、GenBankのhtgsデータベースに対しておこなった。検索のパラメータはExpect値=100、Descriptions値=250、Alignments値=250を用い、フィルターはDefault値とした。検索の結果、多数の疑陽性クローンがヒットしたが、ここで上記YRモチーフとWSモチーフが同一の読み枠にコードされていないもの、あるいは双方のモチーフ配列間に終止コドンのあるものは排除した。また、YRモチーフを保有していても、WSモチーフを保存していないクローンも検索対象から除外した。それは、前述のように完全に確立されたコンセンサス配列ではないYRモチーフに

対する、WSモチーフの保存度の優位性を支持したことに起因する。以上の選別の結果、上記のTblastN検索によって陽性を示した約1000個の疑陽性クローンより、表2に示す一次検索陽性クローンに絞り込まれた。

表にはhtgsデータベースに対する一次検索の結果より得られた陽性クローンのうち、高い確率で標的モチーフ配列を保有していた陽性クローンを、選別して列挙した。モチーフ配列中、保存されたアミノ酸残基を下線を付けた太線で示した。

(表2)

GenBank アクセスション#	モチーフ配列	注
AC008048	WSPWS	IL-2R beta
AC007174	WSEWS	IL-5R
AL031406	WSTWS	CH.22
AC003656	WSGWS	CH.21
AC008663	WSKWS	CH.5
AC008614	WSGWS	CH.5
AC008532	WSGWS	CII.19
AC009267	WSTWS	CH.18
AC007596	WSSWS	CH.16
AC007227	WGEWS	CH.16
AL031123	WSDWA	CH.6
AC005911	WGEWS	CH.12
AL096870	WSNWK	CH.14
Z97201	WSNWK	CII.12
AC007902	WSGWS	CH.18
AC008536	WSMWS	CH.5
AC006176	WSGWS	CH.10
AC004846	WSQWS	なし
AL109843	WQPWS	<u>CH.1 (NR12)</u>
AC003656	WSEWG	CH.21
AC005143	TSGWS	CH.15
AL109743	WSGWS	CH.1
AC008403	WSAWS	CH.19
AL032818	WSGWS	CH.22
Z93017	WSGWS	CH.6
AC009456	WSRWWS	CH.18
AC008427	WSEGS	CH.5
AL096791	WSQWS	CH.X

(2) BlastX検索による二次スクリーニング

続く二次検索の手段として、まず最初に、表2に列挙した28個のTblastN一次検索陽性クローンそれぞれについて、一次検索の質問式配列に対して陽性を示した位置周辺の塩基配列を切り取った。この切り抜いた配列を、さらなる二次検索の質問式として用い、GenBankのnrデータベースに対するBlastX (Advanced Blas

tX 2.0.9)検索をおこなった。ここで質問式配列の調製は、便宜的にWSモチーフをコードし得る配列より上流の約200 bpを含む、合計240 bpの塩基配列とした。その根拠は前述の通り、既知ヘモポエチン受容体のゲノム構造において、このWSモチーフをコードするエキソンが、およそ50～70アミノ酸程度と比較的小さいため、ここで調製する240 bpの質問式配列は充分にエキソン部分をカバーし得ると予測したことによる。BlastX検索のパラメータはExpect値=100、Descriptions値=100、Alignments値=100を用い、フィルターはDefault値とした。この検索によって、一次検索陽性クローンのうち少なくとも、複数の異なる既知ヘモポエチン受容体と、相同性を示し得る陽性クローンが、同受容体ファミリーメンバーをコード可能な、二次検索陽性クローンとして選別されることを期待した。

以上の2段階Blast検索によって、表2に示したヒトゲノムクローンのうち、AC008048、AC007174、及びAL109843の3クローンを二次検索陽性クローンとして同定することに成功した。しかしながら、AC008048とAC007174は、それぞれヒトIL-2受容体ベータ鎖とヒトIL-5受容体、そのものをコードするゲノム配列であることが判明した。一方、残るAL109843は唯一、標的とした新規ヘモポエチン受容体をコード可能であると推測されたため、このクローンをNR12と命名し、全長cDNAの単離を目指すことを決定した。

AL109843は、1999年8月16日にhtgsデータベースに登録されたばかりのヒト染色体第1番に由来するゲノムドラフト配列で、全長149104 bpを有している。しかし現時点では、途中10箇所に及んで合計約8000 bpの塩基配列が未決定のままとなっている。AL109843配列内においてTblastN一次検索によって陽性を示した周辺配列は、図1に示すように、WSエキソンの存在を予測可能であった。この配列中、YRモチーフとして[YVFQVR]配列を認め、WSモチーフとして[WQPWS]配列を認めた。さらにBlastX二次検索において相同性を検出した、既知ヘモポエチン受容体とのアミノ酸配列比較を、図2に示す。以上の結果より、AL109843配列内に予測可能であったエキソン配列の上に、特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを

設計し、これらプライマーを後述の5'-RASE法、及び3'-RACE法に提供した。

(3) オリゴヌクレオチドプライマーの設計

前述の通り、AL109843配列内にエキソン部位を予測し、その予測した配列とともに、下記配列に示すNR12特異的なオリゴヌクレオチドプライマーをデザインした。プライマーは、センス側（下流方向）にNR12-S1、NR12-S2、及びNR12-S3の3本を、またアンチセンス側（上流方向）にNR12-A1、NR12-A2、及びNR12-A3の3本をそれぞれ合成した。プライマーの合成には、ABI社の394 DNA/RNA Synthesizerを使用し、5'-末端トリチル基付加条件にて実施した。その後、OPC column (ABI #400771) にて、完全長の合成産物を精製した。

NR12-S1 ; 5'- GCA ACA GTC AGA ATT CTA CTT GGA GCC -3' (配列番号：1 1)

NR12-S2 ; 5'- CAT TAA GTA CGT ATT TCA AGT GAG ATG TC -3' (配列番号：1 2)

NR12-S3 ; 5'- GGT ACT GGC AGC CTT GGA GTT CAC TG -3' (配列番号：1 3)

NR12-A1 ; 5'- CAG TGA ACT CCA AGG CTG CCA GTA CC -3' (配列番号：1 4)

NR12-A2 ; 5'- GAC ATC TCA CTT GAA ATA CGT ACT TAA TG -3' (配列番号：1 5)

NR12-A3 ; 5'- GGC TCC AAG TAG AAT TCT GAC TGT TGC -3' (配列番号：1 6)

上記に示したオリゴヌクレオチドプライマーの配列設計にあたって、NR12-S1とNR12-A3、NR12-S2とNR12-A2、及びNR12-S3とNR12-A1は、それぞれの組み合わせにおいて、完全な相補的配列を有している。

(4) 5'-RACE法によるN末端 cDNAのクローニング

完全長NR12に相当するcDNAクローンのN末端配列を単離するために、前記(3)のNR12-A1プライマーを一次PCRに用い、また、NR12-A2プライマーを二次PCRに用いて5'-RACE PCRを試みた。鑄型としてHuman Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7403-1)を用い、PCR実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#8417-1)を使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サー

マルサイクラーを使用し、下記のPCR 条件で実施した結果、図3に示す2種類のサイズを示すPCR産物が得られた。

一次PCRの条件は、94°Cで4分、「94°Cで20秒、72°Cで90秒」を5サイクル、「94°Cで20秒、70°Cで90秒」を5サイクル、「94°Cで20秒、68°Cで90秒」を28サイクル、72°Cで3分、および4°Cにて終結である。

二次PCRの条件は、94°Cで4分、「94°Cで20秒、70°Cで90秒」を5サイクル、「94°Cで20秒、68°Cで90秒」を25サイクル、72°Cで3分、および4°Cにて終結である。

得られた2種類のPCR産物は双方とも、pGEM-T Easy vector (Promega #A1360) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA Ligase (Promega#A1360)によって、4°C/12時間の反応をおこなった。PCR 産物とpGEM-T Easy vectorの遺伝子組換え体は、大腸菌株DH5 α (Toyo bo#DNA-903)を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready Blue (Toyobo#PIK-201)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI/Perkin Elmer#4303154)を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析をおこなった。独立する10 クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した結果、塩基対の長さ、及び配列の相違により、1.3 kbのインサートサイズを示す4 クローンの同一配列グループと、1.0 kbのインサートサイズを示す6 クローンの同一配列グループに区別することができた。しかし、前者1.3 kbの5'-RACE PCR産物は、非特異的PCR增幅産物であることが判明した。この配列は図3の5'-RACE PCR産物のうち、マイナーバンドに由来するものである。一方、後者1.0 kbの5'-RACE PCR産物が、正しいPCR增幅反応に由来するNR12の部分塩基配列であることを認めた。

(5) 3'-RACE法によるC末端 cDNAのクローニング

完全長NR12に相当するcDNAクローンのC末端配列を単離するために、前記(3)のNR12-S1プライマーを一次PCRに用い、また、NR12-S2プライマーを二次PCRに用

いて3'-RACE PCRを試みた。鑄型としてHuman Thymus Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7415-1)を使用した以外は、前項の5'-RACE法と全く同様のPCR条件に従いおこなった。即ちPCR実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mix を用いて、Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用した。前記(4)と同様のPCR条件で実施した結果、図3に示すように単一のサイズを示す750 bp の3'-RACE增幅産物が得られた。得られたPCR産物は、前述同様pGEM-T Easy vectorにサブクローニングした後、塩基配列を決定した。PCR産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA Ligaseによって、4°C/12時間の反応をおこなった。PCR産物とvectorの遺伝子組換え体は、大腸菌株DH5 α を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別も前述と同様に、Insert Check Ready Blueを用いた。塩基配列の決定においても、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitを使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencerによって解析を実施した。独立する2クローンの、遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列の決定をおこなった結果、PolyA配列を有する完全長NR12 cDNAクローンのC末端配列を含んでいることを認めた。

この3'RACE-PCRの結果、決定できた塩基配列と、前述(4)において決定した5'RACE-PCR産物の塩基配列とを総合することによって、最終的に細胞分泌型の可溶性受容体蛋白をコード可能なcDNAクローンの全塩基配列を決定し、このcDNAクローンをNR12.1と命名した。決定したNR12.1 cDNAの塩基配列(配列番号: 1)、及びそれがコードするアミノ酸配列(配列番号: 2)を図4に示す。

(6) 3'-RACE法によるC末端スプライシング変異体のクローニング

前述までに単離、及び構造解析を完了したNR12.1クローンは、既知ヘモボエチン受容体の特徴を満足させるものの、細胞膜貫通領域を保有していない。そのため、前記の通り可溶性受容体蛋白をコードするものと推定された。そこで本発明者らは、当該遺伝子の転写産物の特にC末端領域において、細胞膜貫通領域を保有するスプライシング変異体の存在を予測し、継続的な3'-RACE法によるさらなるNR1

2 cDNAクローンの単離を試みた。

そのために、前記（3）のNR12-S2プライマーを一次PCRに用い、また、NR12-S3プライマーを二次PCRに用いて3'-RACE PCRを試みた。鑄型としてHuman Testis Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7414-1)を使用した以外は、前記（4）の5'-RACE法と全く同様のPCR条件に従い実施した。その結果、複数の異なるサイズを示す3'-RACE増幅産物が得られた。得られたPCR産物は全て、前述同様pGEM-T Easy vectorにサブクローニングした後、塩基配列を決定した。独立する6クローンの、遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列の決定をおこなった結果、そのうちの1クローンは、前項までに塩基配列を決定したNR12.1と同一のクローンであることが判明した。残る5クローンについては、何れも標的とした細胞膜貫通領域を保有する細胞膜蛋白をコード可能であった。従い、予測通り本発明者らは、NR12のスプライシング変異体の存在を確認した。上記5つのcDNAクローンは、さらにC末端側の細胞内領域において、選択的スプライシングによる相違を示す。すなわち2クローンは短い細胞内領域しか保有しておらず、これをNR12.2と命名し、一方3クローンにおいては長い細胞内領域をコードしていた。これらの長いORFをコードするcDNAクローンをNR12.3として、それらの配列を区別した。

この3'RACE-PCRの結果、決定できた塩基配列と、前述（4）において決定した5'RACE-PCR産物の塩基配列とを総合することによって、最終的に細胞膜貫通型受容体蛋白をコード可能なcDNAクローンの全塩基配列を決定した。決定したNR12.2 cDNAの塩基配列（配列番号：3）、及びそれがコードするアミノ酸配列（配列番号：4）を図5に示し、さらにNR12.3 cDNAの塩基配列（配列番号：5）、及びそれがコードするアミノ酸配列（配列番号：6）を図6および図7に示した。

なお、上記（2）におけるエキソン部位配列の予測は、ゲノム遺伝子解析ソフト等のプログラムは使用せずに、RNA転写におけるスプライシングコンセンサス配列 (Hames, B.D. and Glover, D.M., *Transcription and Splicing* (Oxford, IR

L Press), 1988, p131-206) より推定した。単離したcDNAクローンの全塩基配列を決定した結果、図1で示したAL109843の部分配列内に予測したエキソン部位は実際のNR12遺伝子転写に用いられるエキソン部位と完全に一致した。ただし、NR12.1 cDNAクローンにおいてのみ、このWSエキソン終結後にスプライシングをおこなわずに、そのままゲノム構造と同一の配列を読み通して3' 非翻訳領域に突入する転写産物であることが判明した。

(7) NR12の構造的特徴と機能予測

NR12.1、NR12.2、及び NR12.3の全塩基配列を決定した結果、これらは選択的スプライシングによって、C末端側において構造の多様性を示す転写産物であることが明らかとなった。一次構造上NR12.1は337アミノ酸からなる可溶性分泌型ヘモボエチン受容体蛋白をコードすることが可能であり、一方、NR12.2とNR12.3においては、それぞれ428アミノ酸と629アミノ酸からなる細胞膜貫通型ヘモボエチン受容体蛋白をコード可能であった。それらNR12の特徴として以下の構造が認められる。

先ずこれらのクローンに共通した細胞外領域において、アミノ酸番号1位のMetから23位のGlyまでが典型的な分泌シグナル配列であると予測される。ここで、1位のMetよりマイナス32位の位置に、インフレームの終止コドンが存在するため、このMet残基が翻訳開始部位であると推定される。次に24位のGlyから124位のProまでによってIg-like領域を構成する。その後の133位のCysと144位のCys残基によってリガンド結合部位である、ループ構造の1つを形成すると推定される。さらに、290位のTyrから295位のArg残基までが、高度に保存されているYRモチーフであり、また、304位のTrpから308位のSer残基までに典型的なWSモチーフが認められる。

ここで、NR12.1においてはWSモチーフ配列の後、29アミノ酸をコードし、次の終止コドンによって翻訳フレームが終結する。これによって、細胞膜貫通ドメインを保持しない、可溶性ヘモボエチン受容体蛋白をコードしている。一方のNR12.

2と NR12.3においては、上記の各保存モチーフに続き、352位のGlyから377位のA sn残基までの26アミノ酸に典型的な細胞膜貫通ドメインが認められる。また、細胞内領域において413位のGln残基までは、NR12.2 とNR12.3は全く同一のアミノ酸配列をコードしているが、以降のC末端領域において選択的スプライシングによって、両者は異なるエキソンに接続するため構造の相違が発生する。即ちNR12.2は428アミノ酸をコードして、次の終止コドンによって翻訳フレームが終結するため、51アミノ酸の短い細胞内領域しか保有していない。他方、NR12.3は629アミノ酸をコードしており、252アミノ酸の細胞内領域を保有していた。以上のような構造的特徴より、NR12遺伝子は新規ヘモボエチン受容体蛋白の特徴を充分に満足させることを認めた。

[実施例2] RT-PCR法によるNR12遺伝子発現組織の検索と発現様態の解析

各ヒト臓器におけるNR12.1遺伝子の発現分布、及び、遺伝子発現様態を解析するために、RT-PCR法によるmRNAの検出を行った。RT-PCR解析に用いるための、センス側（下流方向）プライマーとして下記配列のNR12-PPDプライマーを新たに合成した。アンチセンス側（上流方向）プライマーとしては前記実施例1（3）にて合成したNR12-A1プライマーを用いた。NR12-PPDプライマーの合成、及び精製は前記実施例1（3）に従った。これら[NR12-PPD対NR12-A1]のプライマーセットにより、NR12.1、NR12.2、及びNR12.3の全てのスプライシング変異体において共通のN末端領域の増幅、及び検出が期待される。

hNR12-PPD ; 5'- CCG CCA GAT ATT CCT GAT GAA GTA ACC -3' (配列番号: 17)

鑄型として、Human Multiple Tissue cDNA (MTC) Panel I (Clontech #K1420-1)、Human MTC Panel II (Clontech#K1421-1)、Human Immune System MTC Panel (Clontech#K1426-1)、及びHuman Fetal MTC Panel (Clontech#K1425-1)を用いた。PCRにはAdvantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#8417-1)を用い、Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用した。PCR反応は、94°C

で4分、「94°Cで20秒、72°Cで1分」を5サイクル、「94°Cで20秒、70°Cで1分」を5サイクル、「94°Cで20秒、68°Cで1分」を25サイクル、72°Cで3分、および4°Cにて終結、のサイクル条件にて実施することで、標的遺伝子の増幅を試みた。

この結果、図8に示す通り、成人脾臓、胸腺、リンパ節、骨髓、末梢白血球などの造血担当細胞系組織、及び免疫担当細胞系組織においてNR12の強い遺伝子発現を認め、さらに精巣、肝臓、肺、腎臓、脾臓や、小腸、結腸の消化管においても、その発現を検出した。また、解析をおこなった全てのヒト胎児臓器由来のmRNAにおいても、その遺伝子発現を認めた。ここで、解析に使用した全ての錆型に対して、ヒトG3PDHプライマーを用い上記PCR条件にてハウスキーピング遺伝子G3PDHの発現を検出することで、予め錆型mRNAのコピー数がサンプル間で標準化(normalize)されていることを確認している。

ここで検出されたRT-PCR増幅産物のサイズは561 bpであり、これは決定したNR12 cDNAの塩基配列から計算されるサイズと一致する。従ってこれらは、特異的なPCR増幅反応による産物であると考えられた。このことを更に次項のササンプロットティング法によって確認することで、それらが非特異的なPCR増幅による産物である可能性を否定した。

RT-PCR法によってNR12遺伝子発現分布、及び、遺伝子発現様態の解析結果においては、その発現が検出された臓器、及び組織には制限性があり、各臓器間の発現量においても大きな偏差が認められた。これらNR12の遺伝子発現分布を総合すると、主に免疫担当細胞系組織、及び造血細胞を含むと考えられる組織に強い発現の局在が検出されたことより、NR12が新規ヘモポエチン受容体として機能し得る可能性が、さらに強く示唆された。また、上記以外の組織においても発現分布が認められたことは、NR12が免疫系及び造血系のみならず、多岐にわたる生体内の生理機能を調節し得る可能性をも示唆している。

また、スプライシング変異体の存在は確認された。これらは、ある特定細胞群における、機能特異性を決定するための転写調節や、或いは外来からの刺激要因

による転写誘導、及び選択的なスプライシング調節がおこなわれることによって、NR12の遺伝子発現が厳密な転写制御を受けている可能性を強く示唆する。

[実施例3] サザンプロットティング法によるRT-PCR産物の特異性の確認

実施例2におけるRT-PCRによって増幅された標的遺伝子産物は、NR12特異的なcDNA断片をプローブとして用いるサザンプロットティング法を実施することで、それが特異的な増幅であることを確認した。また、同時にRT-PCR産物を標識シグナル強度によって定量的に検出することで、ヒト各臓器間における遺伝子発現の比較測定的評価を試みた。前項のRT-PCR産物を、アガロースゲル電気泳動後、Hybond N(+) (Amersham, cat#RPN303B)付電荷ナイロン膜にプロットティングし、ハイブリダイゼーションに供した。NR12に特異的なプローブとして、実施例1(4)にて得られたNR12のN末端に相当する5'RACE PCR産物のcDNA断片を用いた。プローブの調製は、Mega Prime Kit (Amersham, cat#RPN1607)を使用し $[\alpha-^{32}P]$ dCTP (Amersham, cat#AA0005)によってラジオアイソトープ標識した。ハイブリダイゼーションにはExpress Hyb-ridization Solution (Clontech#8015-2)を用い、68°C/30分のプレハイブリダイゼーションの後、熱変性させた標識プローブを加え、68°C/120分のハイブリダイゼーションを実施した。(1) 1x SSC / 0.1% SDS, 室温で5分、(2) 1x SSC / 0.1% SDS, 50°Cで30分、(3) 0.1x SSC / 0.1% SDS, 50°Cで30分の条件にて洗浄をおこなった後、Imaging Plate (FUJI#BAS-III)に露光させ、Image Analyzer (FUJIX, BAS-2000 II)によって、NR12特異的なシグナルを検出した。

検出した結果を図9に示す通り、前項のRT-PCRによって増幅のされたPCR産物は、全てNR12に特異的な増幅産物であることが確認された。また各臓器における発現量の比較定量についても、前項の評価を支持するものであった。一方、RT-PCR法とサザンプロットティング法を組み合わせた、ここでの標的遺伝子発現の検出方法は、他の発現解析方法と比較しても極めて感度の高い検出手段であるにも関わらず、成人心臓や骨格筋、及び成人脳、前立腺、卵巣、胎盤においてはNR12の遺伝

子発現が全く検出されなかった。

[実施例4] ノーザンプロッティング法によるNR12遺伝子発現解析

各ヒト臓器、及びヒト癌細胞株におけるNR12の遺伝子発現様態の解析と、NR12転写サイズの同定を目的として、ノーザンプロッティング法によるNR12遺伝子の発現解析を試みた。プロットにはHuman Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (Clontech #7760-1)、Human MTN Blot II (Clontech #7759-1)、Human MTN Blot III (Clontech#7767-1)、及びHuman Cancer Cell Line MTN Blot (Clontech#7757-1)を使用した。

プローブには実施例1(4)にて得られた、5'-RACE産物のcDNA断片を用いた。プローブの調製は実施例3同様、Mega Prime Kitを用い $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPによってラジオアイソトープ標識した。ハイブリダイゼーションにはExpress Hyb-ridization Solutionを用い、65°C/30分のプレハイブリダイゼーションの後、熱変性させた標識プローブを加え、65°C/16時間のハイブリダイゼーションを実施した。(1) 1x SSC / 0.1% SDS, 室温で5分、(2) 1x SSC / 0.1% SDS, 48°Cで30分、(3) 0.5x SSC / 0.1% SDS, 48°Cで30分の条件にて洗浄をおこなった後、前項同様にImaging Plateに対して露光させ、Image Analyzerを使用することで、NR12特異的なシグナルの検出を試みた。

しかしながらその結果、何れのヒト臓器においてもシグナルは検出されなかった。原因として、ノーザン解析法の場合、RT-PCRレベルと比較して検出感度がかなり低いため、発現量の低いmRNAを検出することができなかつたものと考えられる。

[実施例5] 増殖因子依存性細胞株を利用したNR12リガンド検索系の構築

本発明蛋白と特異的に結合するリガンド蛋白のスクリーニングは本発明蛋白の細胞外ドメインを既知のシグナル伝達能を有するヘモボエチン受容体蛋白の細胞

膜貫通ドメインを含む細胞内ドメインと連結させたキメラ受容体を適當な細胞株、好ましくは適當な増殖因子の存在下でのみ生存、及び増殖可能な細胞株（増殖因子依存性細胞株）の細胞表面に発現させた後、当該細胞株を種々の増殖因子、サイトカイン、造血因子等を含むことが期待される材料を添加して培養することにより実施可能である。上記増殖因子依存性細胞株は増殖因子の非存在下では急速に死滅することから、被検材料中に本発明蛋白の細胞外ドメインと特異的に結合するリガンドが存在する場合にのみ、生存と増殖が可能であることを利用することによって、スクリーニング系が成立する。既知ヘモポエチン受容体としては例えば、トロンボポエチン受容体、エリスロポエチン受容体、G-CSF受容体、gp130等が挙げられるが、本スクリーニング系に用いるキメラ受容体のパートナーは上記既知ヘモポエチン受容体に限定されるものではなく、細胞質ドメインにシグナル伝達活性に必要な構造を備えているものであれば何を用いても構わない。また、増殖因子依存性細胞株としてはBa/F3やFDC-P1を始めとした、IL-3依存性細胞株を利用することが可能である。

そこで先ず最初にNR12の細胞外領域（アミノ酸配列；1位のMetから、319位のGlyまで）をコードするcDNA配列をPCRによって増幅し、このDNA断片を既知のヘモポエチン受容体の細胞膜貫通領域、及び細胞内領域をコードするDNA断片と同一翻訳枠で結合させることによって、キメラ受容体をコードする融合配列を作製した。ここで、パートナーとなる既知ヘモポエチン受容体として、前述のようにいくつかの候補が挙げられたが、その中からヒトTPO受容体(Human MPL-P)を選択した。また、上記によって作製したキメラ受容体配列を哺乳動物細胞で発現可能なプラスミドベクターpME18S/neoに挿入した。構築したキメラ受容体(pME18S/ NR12-TPO)の構造模式図を図10に示す。これらキメラ受容体発現ベクターを増殖因子依存性細胞株Ba/F3に導入し強発現させ、安定した遺伝子導入細胞を選択する。ここで遺伝子導入細胞の選択は、上記発現ベクターが薬剤（ネオマイシン）耐性遺伝子を保有していることを利用し、同薬剤添加培地にて薬剤耐性能を獲得した遺伝

子導入細胞のみを選択的に増殖させることが可能である。前述のように、以上によって得られるキメラ受容体発現細胞株を増殖因子（ここではIL-3）非存在下での培養系に切り替え、代替的に標的リガンドを含むことが期待される材料を添加して培養することにより、NR12と特異的に機能結合するリガンドが存在する場合にのみ生存／増殖可能であることを利用した、スクリーニング系を開拓することで新規ヘモボエチンのスクリーニングが実施可能である。

[実施例 6] 細胞分泌型、可溶性リコンビナントNR12蛋白質の発現系構築

本発明蛋白と特異的に結合するリガンド蛋白としては、希ではあるが可溶性蛋白ではなく細胞膜結合型蛋白である可能性も想定される。この様な場合には寧ろ本発明蛋白の細胞外ドメインのみを含む蛋白あるいは当該細胞外ドメインに他の可溶性蛋白の部分配列を付加した融合蛋白を標識後、リガンドを発現していることが期待される細胞との、結合を測定することによりスクリーニングが可能である。

前者の場合には例えば細胞膜貫通ドメインのN端側に終止コドンを挿入することにより人為的に作成した可溶性受容体蛋白、あるいはNR12の可溶型蛋白をコードするNR12.1の配列が利用可能である。また、後者の場合には例えば免疫グロブリンのFc部位やFLAGペプチド等の標識ペプチド配列を細胞外ドメインのC末端に付加することにより調製可能である。またこれらの可溶性標識蛋白質はウエストウエスタン法に於ける検出にも利用可能である。

そこで本発明者らは、NR12の細胞外領域（アミノ酸配列；1位のMetから、319位のGlyまで）をコードするcDNA配列をPCRによって増幅し、このDNA断片のC末端に同一翻訳枠でFLAGペプチド配列を付加することで、当該可溶性標識蛋白をコードする配列の作製を選択した。ここで作製した配列を哺乳動物細胞で発現可能なプラスミドベクターpCHOに挿入した。構築したNR12可溶性受容体標識蛋白(pCHO/NR12-FLAG)の構造模式図を図10に示す。この発現ベクターを哺乳動物細胞株CH

0細胞に導入し強発現させ、安定した遺伝子導入細胞を選択する。当該可溶性蛋白の発現を確認した後、上記発現細胞を大量培養し、その培養上清に分泌される当該リコンビナント蛋白質を抗FLAGペプチド抗体にて免疫沈降可能である。さらに、アフィニティーカラム等による精製が可能である。

以上により得られる当該リコンビナント蛋白質は、上記アッセイ等に用いることができる以外に、例えば、標的リガンドを含むと予測される材料との共存下における特異的結合活性をBIA-COREシステム(Pharmacia社)にて検出することも可能であり、NR12と機能結合し得る新規ヘモボエチンを検索するために、極めて有用であると考えられる。

[実施例7] 完全長ヒトNR12cDNAの再単離

(1) オリゴヌクレオチドプライマーの設計

本発明者らはこれまでに、NR12遺伝子の完全長cDNAの単離に成功したが、それらcDNA単離段階において、5' -RACE 法、及び3' -RACE法を用いたため、標的当該遺伝子はN-末端配列、及び C-末端配列のそれぞれ個別に単離された産物であった。そこで、連続する完全長コーティング配列を含むNR12.2、及びNR12.3遺伝子の再単離を試みた。

先ず、NR12 の各cDNAクローンに共通の塩基配列である翻訳開始コドンであるMet配列を含む、下記配列のセンスプライマー (NR12.1-MET) を設計した。一方、アンチセンスプライマーとして、NR12.2 及びNR12.3のそれぞれに特異的な塩基配列である翻訳終止コドンを含むプライマー (NR12.2-STP、及びNR12.3-STP) を設計した。プライマーの合成は、実施例1 (3) に従った。即ち、ABI社の394 DNA /RNA Synthesizerを使用し、5' -末端トリチル基付加条件にて実施し、その後、0 PC column (ABI#400771) にて、完全長の合成産物を精製した。

NR12.1-MET; 5' - ATG AAT CAG GTC ACT ATT CAA TGG -3' (配列番号 : 18)

NR12.2-STP; 5' - GCA GTC CTC CTA CTT CAG CTT CCC -3' (配列番号 : 19)

NR12.3-STP; 5'- TTG ATT TTG ACC ACA CAG CTC TAC -3' (配列番号: 20)

(2) PCRクローニング

NR12の完全長 CDSを単離するために、前記(1)のNR12.1-METプライマーをセンスプライマーに用い、また、NR12.2-STP及び NR12.3-STPプライマーをアンチセンスプライマーとして用いたPCRクローニングをそれぞれについて試みた。鑄型としてHuman Thymus Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7415-1)を使用し、PCR実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#8417-1)を用いた。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用し、下記のPCR条件で実施した結果、「NR12.1-MET 対NR12.2-STP」のプライマーセットにて1301 bpの増幅産物が得られ、この配列をNR12.4とした。他方「NR12.1-MET 対NR12.3-STP」のプライマーセットにて1910 bpの増幅産物が得られ、この配列をNR12.5として区別した。

PCRの条件は、94°Cで4分、「94°Cで20秒、72°Cで90秒」を5サイクル、「94°Cで20秒、70°Cで90秒」を5サイクル、「94°Cで20秒、68°Cで90秒」を28サイクル、72°Cで3分、および4°Cにて終結である。

得られたPCR産物は実施例1(4)に従い、pGEM-T Easy vector (Promega #A1360)にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA Ligase (Promega#A1360)によって、4°C/12時間の反応を行った。PCR産物とpGEM-T Easy vectorの遺伝子組換え体は、大腸菌株DH5 α (Toyobo#DNA-903)を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready Blue (Toyobo#PIK-201)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、BigDye Terminator Cycle Sequencing SF Ready Reaction Kit (ABI/Perkin Elmer#4303150)を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencerによって解析をおこなった。独立するNR12.4とNR12.5それぞれの遺伝子組換え体に対し、インサート断片の塩基配列の解析を行い、完全長CDSをコードし得るcDNAクローンの配列を決定した。

その結果、PCR実験に用いたプライマーの設計上、NR12.4はNR12.2の完全長ORFを有するが、5' 非翻訳領域は保有しておらず、また3' 非翻訳領域もプライマー由来配列以外はコードしていなかった。また、同様にNR12.5はNR12.3の完全長 ORFを有するが、5' 非翻訳領域保有しておらず、また3' 非翻訳領域もプライマー由来配列以外はコードしていなかった。決定したNR12.4の塩基配列、及びそれがコードするアミノ酸配列を図 1 1、1 2に示し、他方NR12.5の塩基配列、及びそれがコードするアミノ酸配列を図 1 3、1 4に示した。

なお、本発明のNR12.5 cDNAを含むpGEM-T Easy vector(pGEM/NR12.5CDS)によって形質転換した大腸菌株DH5 α を、平成12年7月31日付けで次のように国際寄託した。

寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

寄託日 平成12年7月31日

受託番号 生命研条寄7259号 (FERM BP-7259)

[実施例8] マウスNR12相同ゲノム遺伝子の単離

(1) ヒトNR12プローブ断片の調製

マウスNR12遺伝子のゲノム構造の解析を目指し、マウスGenomic DNAライブラリーに対するブラークハイブリダイゼーションを試みた。異種間交叉Hybridization CloningをマウスゲノムDNAライブラリーに対して実施するために、ヒトNR12のcDNAのプローブ断片を調製した。実施例1(4)にて得られた、ヒトNR12の5'-RACE産物を用い、そのインサート断片をNot Iにて切り出し、精製した産物をプローブ断片とした。インサート断片のアガロースゲルからの切り出し、及び精製はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN#28704)を使用した。プローブの調製は実施例3同様、Mega Prime Kitを用い[α -³²P]dCTPによってラジオアイソトープ標識

し、ブラークハイブリダイゼーションに供した。

(2) ブラークハイブリダイゼーション

ライブラリーとしてLambda FIX IIに構築された マウス129SVJ株 Genomic DNA (Stratagene#946313)を用いた。約32万ブラークのGenomicライブラリーをNZY寒天培地に展開し、Hybond N(+) (Amersham #RPN303B)付電荷ナイロン膜にプロットした後、一次スクリーニングに供した。ハイブリダイゼーションにはPerfect-Hyb Solution (Toyobo#HYB-101)を用い、60°C/ 30分のプレハイブリダイゼーションの後、熱変性させた標識プローブを加え、60°C/ 16時間のハイブリダイゼーションを実施した。1x SSC/ 0.1% SDSを室温で5分、1x SSC/ 0.1% SDSを50°Cで30分、0.5x SSC/ 0.1% SDSを50°Cで30分の条件にて洗浄を行った後、X線フィルム(Hyperfilm MP:Amersham, #RPN8H)に露光し、NR12陽性ブラークを検出した。

その結果、陽性或いは疑陽性を示す独立した6クローンが得られた。一次スクリーニングによって得られたこの6クローンに対し、同様に二次スクリーニングを行った結果、NR12陽性を示す独立した2クローンのブラークの単離に成功した。単離したブラークのLambda DNAはプレート溶菌法により大量調製した。制限酵素Sal Iにてインサート断片を切り出し、それらのサイズを確認したところ、それぞれ約18.5kbと約16.0kbであると推定された。

産業上の利用の可能性

本発明により新規なヘモボエチン受容体蛋白質及びそれをコードするDNAが提供された。また、該DNAが挿入されたベクター、該DNAを保持する形質転換体、該形質転換体を利用した組換え蛋白質の製造方法が提供された。さらに、該蛋白質に結合する天然のリガンドあるいは化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明の蛋白質は、生体免疫調節、或いは造血細胞調節に直接的に関与すると考えられることから、生体における免疫応答、或いは造血機構の抜本的な特性の理解と、それに基づく免疫関連疾患や造血関連疾患の診断や治療への応用が期待さ

れる。

特に、本発明のNR12分子と機能結合し得る、その未知の造血因子の単離することは重要であり、それを目的とするスクリーニングをおこなう上で、本発明の遺伝子を利用することは極めて有用であると考えられる。さらに、NR12分子と機能結合し得るアゴニスト、或いはアンタゴニストの検索を、ペプチドライブラリー、または合成化学材料に対しておこない、単離同定することも有効である。

上に述べた通り、NR12遺伝子は、それがコードする受容体蛋白と機能結合し得る、未知の造血因子やアゴニストを得るために有用な材料を提供するものと考えられる。このような機能結合物質、或いはNR12分子機能を活性化し得る特異的抗体の生体投与により、生体の細胞性免疫の増強や造血機能の増強が可能であると予測される。つまり、免疫担当細胞、或いは造血細胞の増殖促進剤、または分化誘導剤、或いは免疫細胞機能活性化剤としての臨床応用が可能であると考えられる。また、それらを介してある特定種の癌組織に対する細胞傷害性免疫を高めることも可能であると考える。さらに、NR12の発現はこれら造血組織中の限られた細胞集団に特異的に発現している可能性が想定され、この細胞集団を分離する手段として抗 NR12抗体は有用である。この様にして分離された細胞集団は細胞移植療法への応用が可能である。

一方、NR12のスプライス変異体であるNR12.1はデコイ (decoy) 型受容体としてNR12リガンドに対する阻害剤としての利用が想定される。また、NR12分子に機能結合し得るアンタゴニストや、その他阻害剤、或いはNR12分子機能を阻害し得る特異的抗体の生体投与により、生体の細胞性免疫の抑制や造血細胞の増殖抑制が可能であると予測される。このような阻害物質は免疫担当細胞や造血細胞の増殖抑制剤、または分化抑制剤、或いは免疫抑制剤や抗炎症剤としての臨床応用が可能であると考えられる。具体的には、自己組織傷害性に起因する自己免疫疾患発症の抑制や、移植免疫の領域において最大の問題となる、生体免疫による組織拒絶応答の抑制にも応用できる可能性もある。さらには、免疫反応の異常亢進によ

り惹起される疾患領域に対して、極めて有効であると考えられ、金属や花粉などに対する種々の抗原特異的アレルギーに対しても、上記阻害剤を用いた免疫抑制による解決が有効であると考えられる。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のDNA。
 - (a) 配列番号：2、4、6、8、または10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。
 - (b) 配列番号：1、3、5、7、または9のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。
 - (c) 配列番号：2、4、6、8、または10のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2、4、6、8、または10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。
 - (d) 配列番号：1、3、5、7、または9のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：2、4、6、8、または10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。
2. 配列番号：2、4、6、8、または10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA。
3. 請求項1または2に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド。
4. 請求項1または2に記載のDNAが挿入されたベクター。
5. 請求項1または2に記載のDNAまたは請求項4に記載のベクターを保持する形質転換体。
6. 請求項5に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質を回収する工程を含む、請求項3に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。
7. 請求項3に記載の蛋白質に結合する抗体。
8. 配列番号：1、3、5、7、または9のいずれかに記載の塩基配列からな

るDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

9. 請求項3に記載の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、
(a) 該蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、
(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、
(c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

1 / 1 4

☒ 1

- 1 ttttataaaagaacactttgtttcccttagagtcagaaggacaggcttggAACATAATAGG
61 tggttaccatcacatttctgctaaaaataataggttttaaaaggacaccacatttttat
121 tggttaccatccattttagGTTAAAGAATTGACACCAATTACATATGTGCAACAGTC
Val¹Lys²Glu³Phe⁴Asp⁵Thr⁶Asn⁷Phe⁸Thr⁹Val¹⁰Gln¹¹Gln¹²Ser
181 AGAATTCTACTGGAGCCAAACATTAAGTACGTATTCAAGTGAAGATGTCAAGAACAGG
Glu¹Phe²Tyr³Leu⁴Glu⁵Pro⁶Asn⁷Ile⁸Lys⁹Tyr¹⁰Val¹¹Phe¹²Gln¹³Val¹⁴Arg¹⁵Cys¹⁶Gln¹⁷Glut¹⁸Thr¹⁹Gly
241 CAAAGGTACTGGCAGGCCCTGGAGTTCACTGTTTCATAAAACACCTGAAACAGgtqa
Lys¹Arg²Tyr³Tyr⁴Gln⁵Pro⁶Trp⁷Ser⁸Leu⁹Phe¹⁰Phe¹¹His¹²Lys¹³Thr¹⁴Pro¹⁵Glu¹⁶Thr¹⁷
301 gtgtacttataattttatctgttgggcattttatatatatctgttgcgttagcaca

図2

hNR12 LEPNIKYYVFRQVR[C]-QETGKRYWQPWS

gp130 LKPFTIYVVERIRCM[E]D[GKGYWSDWS

hNR12 YLEPN[KYVFEVVR[C]-Q-ETGKRYWQPWS

hNR 9 HDPNVDYQFRV-CARGD-[GRQEN]SPWS

hNR12 QQSSEFY---[EPNIKYVFRQVR[C]-ETGKRYWQPWS-SLFFHKTP

hPRLR QQIEFKILS[HPCQKYIVQVR[C]-KPDHGYMSAWSPATFIQIP

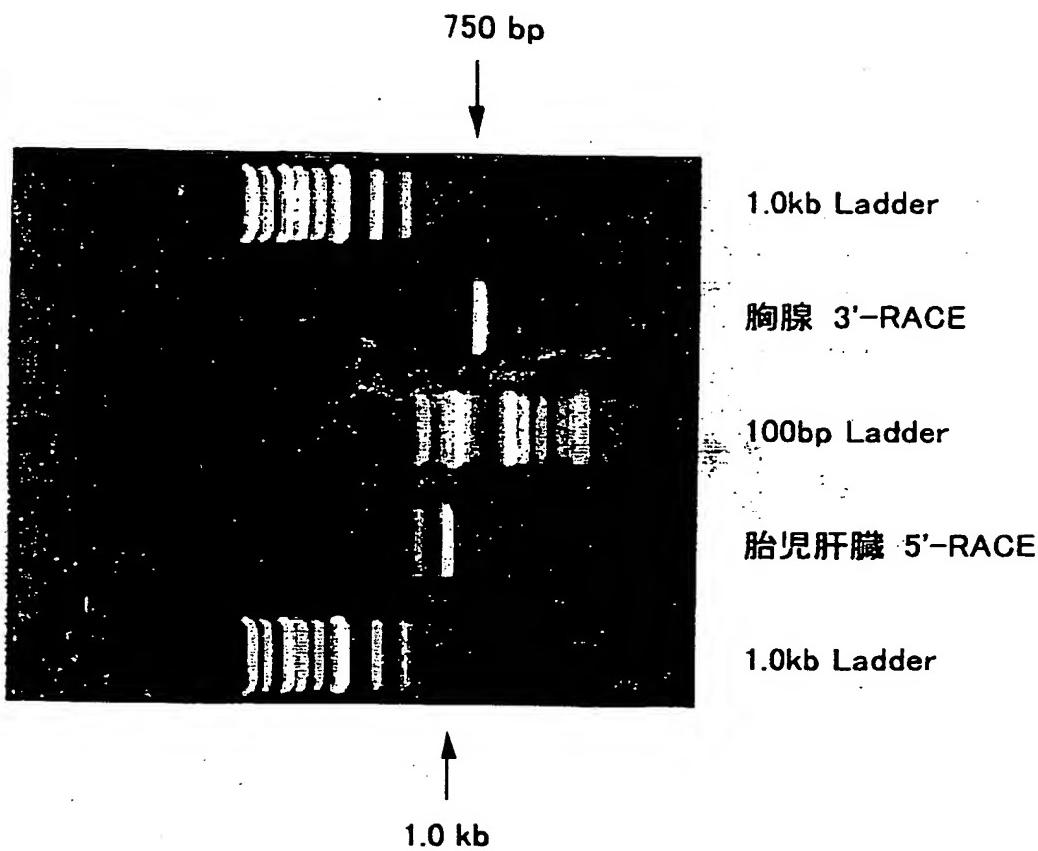
hNR12 TNFTYVQOSEFY[E]PNIKY-VFQVRC-QE-TGKRYWQPWS-SLFFHKTP

hIL7R TKLTIVQR-K--[QPAAMYE]-KVR[SIMPHYRKGYMSEWSPS-YVFRTP

hNR12 LEPN-[KYVFRQVR[C]-ETG-KRYWQPWS-SLFFHKTP

hLIFR LNPYTH-YTFR[RCSTETFWK-[NSKWNSKKQHL[T

図3



4 / 14

4

1 ATGACACAGCCAACAAGGGTGGCAGCCTGGCTCTGAAGTGGATTATGTGCTTCAAACAG
61 GTTAAAAGAGGGAAACAGTCTTCTGCTCCAGACATGAATCAGGTCACTATTCAATG
MetAsnGlnValThrIleGlnTrp
121 GGATGCAGTAATAGCCCTTACATACTCTCAGCTGGTGTCACTGGAGGAATTACAAATAT
AspAlaValIleAlaLeuTyrIleLeuPheSerTrpCysHisGlyGlyIleThrAsnIle
181 AAACTGCTCTGGCCACATCTGGTAGAACCAAGGCCACAATTAAAGATGGGTGTGAATAT
AsnCysSerGlyHisIleTrpValGluProAlaIlePheLysMetGlyValAsnIle
241 CTCTATATATTGCCAAGCAGCAATTAAAGAACTGCCAACCAAGGAAACTTCATTAA
SerIleTyrCysGlnAlaAlaIleLysAsnCysGlnProArgLysLeuHisPheTyrLys
301 AAATGGCATCAAAGAAAAGATTCAAATCACAAAGGATTAAATAAAACAAACAGCTGGCTTTG
AsnGlyIleLysGluArgPheGlnIleThrArgIleAsnLysThrThrAlaArgLeuTrp
361 GTATAAAAACCTTCTGGAACCACATGCTTCTATGTACTGCACTGCTGAATGTCCCAAACA
TyrLysAsnPheLeuGluProHisAlaSerMetTyrCysThrAlaGluCysProLysHis
421 TTTTCAAGAGACACTGATATGTGGAAAAGACATTCTCTGGATATCCGCCAGATATTCC
PheGlnGluThrLeuIleCysGlyLysAspIleSerSerGlyTyrProProAspIlePro
481 TGATGAAGTAACCTGTGTCAATTATGAATATTCAAGGAAACATGACTTGCACCTGGAATGC
AspGluValThrCysValIleTyrGluTyrSerGlyAsnMetThrCysThrTrpAsnAla
541 TGGGAGGCTCACCTACATAGACACAAAATACGTGGTACATGTGAAGAGTTAGAGACAGA
GlyArgLeuThrTyrIleAspThrLysTyrValValHisValLysSerLeuGluThrGlu
601 AGAAGAGCAACAGTATCTCACCTCAAGCTATATTAAACATCTCCACTGATTCAATTACAAGG
GluGluGlnGlnTyrLeuThrSerSerTyrIleAsnIleSerThrAspSerLeuGlnGly
661 TGGCAAGAAGTACTTGTTGGTCCAAGCAGCAAACGCACTAGGCATGGAAGAGTCAAA
GlyLysTyrLeuValTrpValGlnAlaAlaAsnAlaLeuGlyMetGluGluSerLys
721 ACAACTGCCAATTCTCACCTGGATGATATAGTGTACTTCTGCAGCCGTATTCCAGGGC
GlnLeuGlnIleHisLeuAspAspIleValIleLeuSerAlaAlaValIleSerArgAla
781 TGAGACTATAAAATGCTACAGTGCCAAGACCATAATTATTGGGATAGTCACAAACAAT
GluThrIleAsnAlaThrValProLysThrIleIleTyrTrpAspSerGlnThrThrIle
841 TGAAAAGGTTCTGTGAAATGAGATACAAGGCTACAACAAACAAACTTGGAAATGTTAA
GluLysValSerCysGluMetArgTyrLysAlaThrThrAsnGlnThrTrpAsnValLys
901 AGAATTGACACCAATTACATATGTGCAACAGTCAGAAATTCTACTTGGAGCCAAACAT
GluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSerGluPheTyrLeuGluProAsnIle
961 TAAGTACGTATTCAAGTGAGATGTCAAGAAACAGGCAAAAGGTACTGGCAGCCTGGAG
LysTyrValPheGlnValArgCysGlnGluThrGlyLysArgTyrTrpGlnProTrpSer
1021 TTCACTGTTTTCTATAAAACACCTGAAACAGGTGAGTGTACTTATATATTATTCTGT
SerLeuPhePheHisLysThrProGluThrGlyGluCysThrTyrIlePheTyrSerVal
1081 TGGGCTTTCTTATATATCTTCTGCTGAGCACAGTGGCTCACGCCGTAAATTCCAGC
GlyLeuPhePheIleTyrLeuPheCys***
1141 ACTTTGAGAGGCCAAGGCAGGAAGATTGCTTGAGCCTAGGAGTTGAGACTGGCCTGGGC
1201 AACATGGTGAGACCCTAGTCTGTACAGAAAAATAATAATTATTATTAGCCTGGGTGGGG
1261 AATGCATTGTAGTCGAGCTACTGGGAGGCTGAGGTAGTAGGATTGCGTGAGCCCCGG
1321 AGTTTGATGCTGCAGTGAAGCTATGATCATCCCAGTCTAGCCTGGAGGAAAGACCA
1381 AGACCCCTGTTCTAAAAAGTTAAAACAGCCAGGTGCAGTGGCTTATGTCGTAATCCC
1441 AGCACCTGGGAGGCCAAGGTGGGATTACCTTAGGTCAAGGACTTCAGAACCTCCCG
1501 GCCGACATGGTAAACCCCTGCTCTACTAAAAATAACGAAAATTAGCTGGGATGGTGGCA
1561 GGTGCCTGTAATCTCAGCTACTCGGAAGGCTGAGGCAGGAAAATTGCTTGAACCCAAGAA
1621 GTGGAGGGTTCAGTGAACGTGAGATTGTAACCAACCGCACTCCAGCCTGGCCAAGAGAGAG
1681 ACTTGGTCTCAAAAAAAAAAAATAAAAAATAATAATAATAATAAGTTAAAACAAAAA
1741 TAAAGCTACAAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

5 / 1 4

☒ 5

1 ATGACACAGCCAACAAGGGTGGCAGCCTGGCTCTGAAGTGGAAATTATGTGCTTCAAACAG
 61 GTTGAAAGAGGGAAACAGTCTTTCTGCTCCAGACATGAATCAGGTCACTATTCAATG
 MetAsnGlnValThrIleGlnTrp
 121 GGATGCAGTAATAGCCCTTACATACTCTTCAGCTGGTGTATGGAGGAATTACAAATAT
 AspAlaValIleAlaLeuTyrIleLeuPheSerTrpCysHisGlyGlyIleThrAsnIle
 181 AAACTGCTCTGCCACATCTGGTAGAACCCAGCCACAATTAAAGATGGGTGTGAATAT
 AsnCysSerGlyHisIleTrpValGluProAlaThrIlePheLysMetGlyValAsnIle
 241 CTCTATATATTGCCAACGAGCAATTAAAGAACTGCCAACCAAGGAAACTTCATTAA
 SerIleTyrCysGlnAlaAlaIleLysAsnCysGlnProArgLysLeuHisPheTyrLys
 301 AAATGGCATCAAAGAAAGATTCAAATCACAGGATAATAAAAACACAGCTGGCTTG
 AsnGlyIleLysGluArgPheGlnIleThrArgIleAsnLysThrThrAlaArgLeuTrp
 361 GTATAAAAACCTTCTGGAACCACATGCTTCTATGTACTGCACTGCTGAATGTCCAAACA
 TyrLysAsnPheLeuGluProHisAlaSerMetTyrCysThrAlaGluCysProLysHis
 421 TTTTCAAGAGACACTGATATGTGGAAAAGACATTCTCTGGATATCCGCCAGATATTCC
 PheGlnGluThrLeuIleCysGlyLysAspIleSerSerGlyTyrProProAspIlePro
 481 TGATGAAGTAAACCTGTGTCAATTAAAGAACATGACTTGCACCTGGAATGCG
 AspGluValThrCysValIleTyrGluTyrSerGlyAsnMetThrCysThrTrpAsnAla
 541 TGGGAGGCTCACCTACATAGACACAAAATACGTGGTACATGTGAAGAGTTAGAGACAGA
 GlyArgLeuThrTyrIleAspThrLysTyrValValHisValLysSerLeuGluThrGlu
 601 AGAACAGAACAGTATCTCACCTCAAGCTATATTAAACATCTCCACTGATTACAAAGG
 GluGluGlnGlnIleHisLeuAspAspIleLeuSerAlaAlaValIleSerArgAla
 661 TGGCAAGAAGTACTTGGTTGGTCCAAGCAGCAAACGCACTACGGCATGGAAGAGTC
 GlyLysLysTyrLeuValTrpValGlnAlaAlaAsnAlaLeuGlyMetGluGluSerLys
 721 ACAACTGCAAATTCTGGATGATAGTGTACTTCTGCAGCCGTATTCCAGGGC
 GlnLeuGlnIleHisLeuAspAspIleLeuSerAlaAlaValIleSerArgAla
 781 TGAGACTATAAAATGCTACAGTGCCAACAGCATAATTATTGGGATAGTC
 GluThrIleAsnAlaThrValProLysThrIleIleTyrTrpAspSerGlnThrThrIle
 841 TGAAAAGGTTCCCTGTGAAATGAGATACAAGGCTACAACAAACAAACTTGGAAATGTTAA
 GluLysValSerCysGluMetArgTyrLysAlaThrThrAsnGlnThrTrpAsnValLys
 901 AGAATTGACACCAATTTCACATATGTGCAACAGTCAGAATTCTACTTGGAGGCCAAACAT
 GluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSerGluPheTyrLeuGluProAsnIle
 961 TAAGTACGTATTCAAGTGAGATGTCAGAACAGGCAAAGGTACTGGCAGCCTGGAG
 LysTyrValPheGlnValArgCysGlnGluThrGlyLysArgTyrTrpGlnProTrpSer
 1021 TTCACTGTTTTCTAAAAACACCTGAAAACAGTCCCCAGGTACATCAAAGCATTCCA
 SerLeuPhePheHisLysThrProGluThrValProGlnValThrSerLysAlaPheGln
 1081 ACATGACACATGGAATTCTGGCTAACAGTTGCTTCCATCTCACAGGGCACCTTACTTC
 HisAspThrTrpAsnSerGlyLeuThrValAlaSerIleSerThrGlyHisLeuThrSer
 1141 TGACAAACAGAGGAGACATTGGACTTTATTGGGAATGATCGTCTTGCTGTATGTTGTC
 AspAsnArgGlyAspIleGlyLeuLeuLeuGlyMetIleLeuPheAlaValIleGlySer
 1201 AATTCTTCTTGATTGGGATATTAAACAGATCATTCCGAACTGGGATTAAAAGAAGGAT
 IleIleSerLeuIleGlyIlePheAlaArgSerPheArgThrGlyIleLysArgArgIle
 1261 CTTATTGTTAACCAAAAGTGGCTTATGAAGATATTCTTAATATGAAAAACAGCAATGT
 LeuLeuLeuIleProLysTrpLeuTyrGluAspIleProAsnMetLysAsnSerAsnVal
 1321 TGTGAAAATGCTACAGCCAGGTGTGGTGTGCTCTGTGATCCCAGCTACTTGGGAAG
 ValLysMetLeuGlnProGlyValValValCysSerCysAspProSerTyrLeuGlySer
 1381 CTGAAGTAGGAGGACTGCTTGAGCCAGGAGTCCAACACCAGCTCACACATACCAAGA

 1441 CCCTGTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

6 / 14

図 6

1 ATGACACAGCCAACAAGGGTGGCAGCCTGGCTCTGAAGTGGATTATGTGCTTCAAACAG
 61 GTTGAAAGAGGGAAACAGTCTTCCCTGCTCCAGACATGAATCAGGTCACTATTCAATG
MetAsnGlnValThrIleGlnTrp
 121 GGATGCAGTAATAGCCCTTACATACTCTTCAGCTGGTGTCA~~TGGAGGAATTACAAATAT~~
AasAlaValIleAlaLeuTyrIleLeuPheSerTrpCysHisGlyGlyIleThrAsnIle
 181 AAACTGCTCTGGCCACATCTGGGTAGAACCCAGGCCACAATTTAAGATGGGTGTGAATAT
AsnCysSerGlyHisIleTrpValGluProAlaThrIlePheLysMetGlyValAsnIle
 241 CTCTATATATTGCCAAGCAGCAATTAAAGAACTGCCAACCAAGGAAACTTCATTAA
SerIleTyrCysGlnAlaAlaIleLysAsnCysGlnProArgLysLeuHisPheTyrLys
 301 AAATGGCATCAAAGAAAGATTCAAATCACAGGATAATAAAAACACAGCTGGCTTGG
AsnGlyIleLysGluArgPheGlnIleThrArgIleAsnLysThrThrAlaArgLeuTrp
 361 GTATAAAAACCTTCTGGAACCATGCTTCTATGTACTGCACTGCTGAATGTCCCACAA
TyrLysAsnPheLeuGluProHisAlaSerMetTyrCysThrAlaGluCysProLysHis
 421 TTTTCAAGAGACACTGATATGTGGAAAAGACATTCTCTGGATATCCGCCAGATATTCC
PheGlnGluThrLeuIleCysGlyLysAspIleSerSerGlyTyrProProAspIlePro
 481 TGATGAAGTAACCTGTGTCATTGAATATTCA~~GGCAACATGACTTGACACCTGGAATGC~~
AspGluValThrCysValIleTyrGluTyrSerGlyAsnMetThrCysThrTrpAsnAla
 541 TGGGAGGCTCACCTACATAGACACAAAATACGTGGTACATGTGAAGAGTTAGAGACAGA
GlyArgLeuThrTyrIleAspThrLysTyrValValHisValLysSerLeuGluThrGlu
 601 AGAAGAGCAACAGTATCTCACCTCAAGCTATATTAAACATCTCACTGATTCAATTACAGG
GluGluGlnGlnTyrLeuThrSerSerTyrIleAsnIleSerThrAspSerLeuGlnGly
 661 TGGCAAGAAGTACTTGGTTGGTCCAAGCAGCAAACGCACTAGGCATGGAAAGAGTC
GlyLysTyrLeuValTrpValGlnAlaAlaAsnAlaLeuGlyMetGluGluSerLys
 721 ACAACTGCAAATTCACCTGGATGATAGT~~GATACTTCTGCAGCCGT~~
GlnLeuGlnIleHisLeuAspAspIleValIleLeuSerAlaAlaValIleSerArgAla
 781 TGAGACTATAATGCTACAGTGCCCAAGACCATAATTATTGGATAGTC
GluThrIleAsnAlaThrValProLysThrIleIleTyrTrpAspSerGlnThrThrIle
 841 TGAAAAGGTTCTGTGAAATGAGATA~~CAAGGCTACAACAAACAAACTGG~~
GluLysValSerCysGluMetArgTyrLysAlaThrThrAsnGlnThrTrpAsnValLys
 901 AGAATTGACACCAATTACATATGTGCAACAGTCAGAATTCTACTTGGAGC
GluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSerGluPheTyrLeuGluProAsnIle
 961 TAAGTACGTATTC~~CAAGT~~
LysTyrValPheGlnValArgCysGlnGluThrGlyLysArgTyrTrpGlnProTrpSer
 1021 TTCACTGTTTTCTATAAAACACCTGAAACAGTCCCCAGGT~~CACAT~~
SerLeuPhePheHisLysThrProGluThrValProGlnValThrSerLysAlaPheGln
 1081 ACATGACACATGGAAATTCTGGGCTAACAGTGCTTCCATCTCACAGGGCACCTTACTTC
HisAspThrTrpAsnSerGlyLeuThrValAlaSerIleSerThrGlyHisLeuThrSer

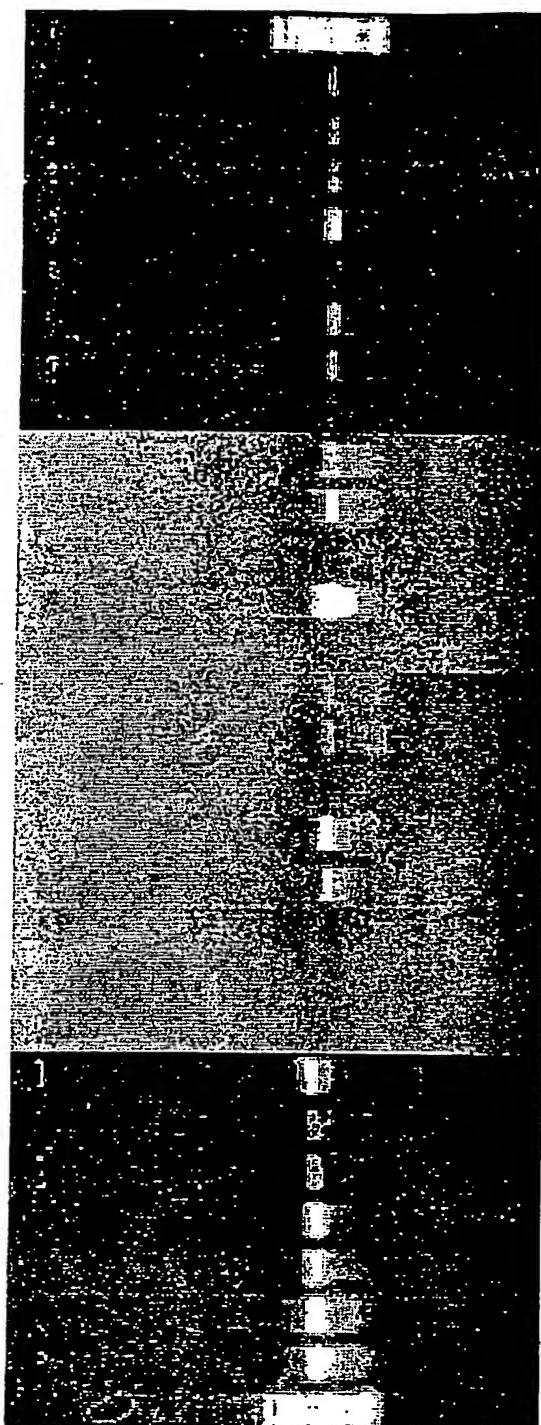
7 / 14

☒ 7

1141 TGACAAACAGAGGAGACATTGGACTTTATTGGGAATGATCGTCTTGCTGTTATGTTGTC
 AspAsnArgGlyAspIleGlyLeuLeuLeuGlyMetIleValPheAlaLeuIleMetLeuSer
 1201 AATTCTTCTTGATTGGGACATTTAACAGATCATTCCGAACGGGATAAAAGAAGGAT
 IleLeuSerIleIleIleGlyThrPheAspArgSerPheArgThrGlyIleLysArgArgIle
 1261 CTTATTGTTAACCAAAAGTGGCTTATGAAGATATTCTAATATGAAAAACAGCAATGT
 LeuLeuLeuIleProLysTrpLeuTyrGluAspIleProAsnMetLysAsnSerAsnVal
 1321 TGTGAAAATGCTACAGGAAAATAGTGAACCTATGAATAATAATTCCAGTGAGCAGGTCCT
 ValLysMetLeuGlnGluAsnSerGluLeuMetAsnAsnAsnSerSerGluGlnValLeu
 1381 ATATGTTGATCCCAGTACAGAGATAAAAGAAATCTTCATCCAGAACACAAGCCTAC
 TyrValAspProMetIleThrGluIleLysGluIlePheIleProGluHisLysProThr
 1441 AGACTACAAGAAGGAGAATACAGGACCCCTGGAGACAAGAGACTACCCGAAAATCGCT
 AspTyrLysLysGluAsnThrGlyProLeuGluThrArgAspTyrProGlnAsnSerLeu
 1501 ATTGACAATACTACAGTTGTATATATTCTGATCTAACACTGGATATAAACCCCAAAT
 PheAspAsnThrThrValValTyrIleProAspLeuAsnThrGlyTyrLysProGlnIle
 1561 TTCAAATTTCTGCCTGAGGGAAAGCCATCTCAGTAATAATAATGAAATTACTCCTTAAC
 SerAsnPhaLeuProGluGlySerHisLeuSerAsnAsnAsnGluIleThrSerLeuThr
 1621 ACTTAAACCACCAAGTTGATTCTTAGACTCAGGAAATAATCCCAGGTTACAAAGCATCC
 LeuLysProProValAspSerLeuAspSerGlyAsnAsnProArgLeuGlnLysHisPro
 1681 TAATTTGCTTTCTGTTCAAGTGTGAATTCACTAACGAAACACAATATTCTGGAGA
 AsnPheAlaPheSerValSerSerValAsnSerLeuSerAsnThrIlePheLeuGlyGlu
 1741 ATTAAGCCTCATATTAAATCAAGGAGAATGCAGTTCTCCTGACATACAAACTCAGTAGA
 LeuSerLeuIleLeuAsnGlnGlyGluCysSerSerProAspIleGlnAsnSerValGlu
 1801 GGAGGAAACCACCATGCTTGGAAAATGATTCACCCAGTGAAACTATTCCAGAACAGAC
 GluGluThrThrMetLeuLeuGluAsnAspSerProSerGluThrIleProGluGlnThr
 1861 CCTGCTTCTGATGAATTGTCTCCTGTTGGGGATCGTAATGAGGAGTTGCCATCTAT
 LeuLeuProAspGluPheValSerCysLeuGlyIleValAsnGluGluLeuProSerIle
 1921 TAATACTTATTTCACAAAATATTGGAAAGCCACTCAATAGGATTCACTCTGGAA
 AsnThrTyrPheProGlnAsnIleLeuGluSerHisPheAsnArgIleSerLeuLeuGlu
 1981 AAAGTAGAGCTGTGGTCAAAATCAATATGAGAAAGCTGCCTTGCACATCTGAACTTGGG
 Lys***
 2041 TTTTCCCTGCAATAGAAATTGAATTCTGCCTTTGAAAAAAATGTATTCACATCCCA
 2101 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

8 / 14

図8



胎児胸腺
胎児脾臓
胎児骨格筋
胎児肺
胎児肝臓
胎児腎臓
胎児心臓
胎児脳
大腸
小腸
卵巢
精巣
前立腺
脾臓
腎臓
骨格筋
肝臓
肺 胎盤
脳 心臓
扁桃
胎児肝臓
骨髓
PBL
胸腺
リンパ節
脾臓

9 / 14

図 9

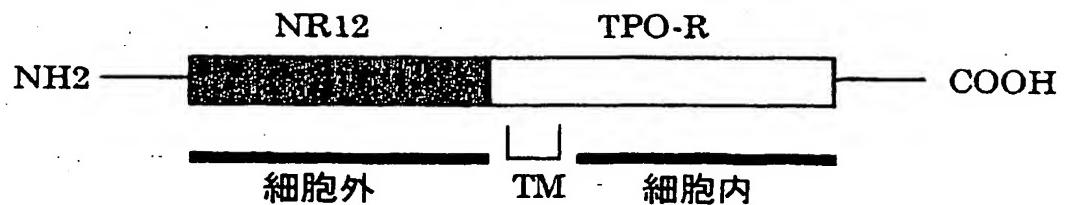
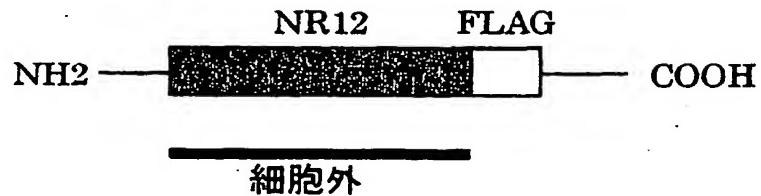


NR12

胎児胸腺
胎児脾臓
胎児骨格筋
胎児肺
胎児肝臓
胎児腎臓
胎児心臓
胎児脳
大腸
小腸
卵巢
精巣
前立腺
膀胱
腎臓
骨格筋
肝臓
肺
胎盤
脳
心臓
扁桃
胎児肝臓
骨髓
PBL
胸腺
リンパ節
脾臓

10 / 14

図 10

pME18S/NR12-TPORpCHO/NR12-FLAG

11 / 14

☒ 1 1

1 ATGAATCAGGTCACTATTCAATGGGATGCAGTAATAGCCCTTACATACTCTTCAGCTGG
METAsnGlnValThrIleGlnTrpAspAlaValIleAlaLeuTyrIleLeuPheSerTrp
 61 TGTCACTGGAGGAATTACAAATATAAACTGCTCTGCCACATCTGGTAGAACCGCCACA
CysHisGlyGlyIleThrAsnIleAsnCysSerGlyHisIleTrpValGluProAlaThr
 121 ATTTTAAGATGGGTATGAATATCTCTATATATTGCCAAGCAGCAATTAGAACTGCCAA
IlePheLysMETGlyMETAsnIleSerIleTyrCysGlnAlaAlaIleLysAsnCysGln
 181 CCAAGGAAACTTCATTTTATAAAAATGGCATCAAAGAAAGATTCAAATCACAAAGGATT
ProArgLysLeuHisPheTyrLysAsnGlyIleLysGluArgPheGlnIleThrArgIle
 241 AATAAAACACAGCTCGGCTTGGTATAAAACTTCTGGAACCACATGCTTCTATGTAC
AsnLysThrThrAlaArgLeuTrpTyrLysAsnPheLeuGluProHisAlaSerMETTyr
 301 TGCACTGCTGAATGTCCAAACATTTCAGAGACACTGATATGTGGAAAAGACATTCT
CysThrAlaGluCysProLysHisPheGlnGluThrLeuIleCysGlyLysAspIleSer
 361 TCTGGATATCCGCCAGATATTCTGATGAAAGTAACCTGTGTCAATTATGAATATTCAAGGC
SerGlyTyrProProAspIleProAspGluValThrCysValIleTyrGluTyrSerGly
 421 AACATGACTTGCACCTGGAATGCTGGAGCTCACCTACATAGACACAAAATACGTGGTA
AsnMETThrCysThrTrpAsnAlaGlyLysLeuThrTyrIleAspThrLysTyrValVal
 481 CATGTGAAGAGTTAGAGACAGAAGAAGAGCAACAGTATCTCACCTCAAGCTATATTAAC
HisValLysSerLeuGluThrGluGluGlnGlnTyrLeuThrSerSerTyrIleAsn
 541 ATCTCCACTGATTCAAGGTGGCAAGAAGTACTTGGTTGGGTCCAAGCAGCAAAC
IleSerThrAspSerLeuGlnGlyGlyLysLysTyrLeuValTrpValGlnAlaAlaAsn
 601 GCACTAGGCATGGAAGAGTCAAAACAACGCAAAATTCACCTGGATGATATAGTGATACCT
AlaLeuGlyMETGluGluSerLysGlnLeuGlnIleHisLeuAspAspIleValIlePro
 661 TCTGCAGCCGTCAATTCCAGGGCTGAGACTATAAAATGCTACAGTGCCAAGACCATAATT
SerAlaAlaValIleSerArgAlaGluThrIleAsnAlaThrValProLysThrIleIle
 721 TATTGGGATAGTCAAACAAACAATTGAAAAGGTTCTGTGAAATGAGATACAAGGCTACA
TyrTrpAspSerGlnThrThrIleGluLysValSerCysGluMETArgTyrLysAlaThr
 781 ACAAAACAAACTTGGATGTTAAAGAATTGACACCAATTTCACATATGTGCAACAGTC
ThrAsnGlnThrTrpAsnValLysGluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSer
 841 GAATTCTACTTGGAGCCAAACATTAAGTACGTATTCAAGTGAGATGTCAAGAACAGGC
GluPheTyrLeuGluProAsnIleLysTyrValPheGlnValArgCysGlnGluThrGly
 901 AAAAGGTACTGGCAGCCTGGAGTTCACTGTTTTCTATAAAACACCTGAAACAGTTCCC
LysArgTyrTrpGlnProTrpSerSerLeuPhePheHisLysThrProGluThrValPro
 961 CAGGTACATCAAAAGCATTCCAACATGACACATGGAATTCTGGCTAACAGTTGCTTCC
GlnValThrS rLysAlaPheGlnHisAspThrTrpAsnSerGlyLeuThrValAlaSer
 1021 ATCTCTACAGGGCACCTTACTTCTGACAACAGAGGAGACATTGGACTTTATTGGAAATG
IleS rThrGlyHisLeuThrS rAspAsnArgGlyAspIleGlyLeuLeuLeuGlyMET

1 2 / 1 4

图 1 2

1081 ATCGTCTTGCTGTTATGTTGTCAATTCTTCTTGATTGGGATATTAACAGATCATTC
IleValPheAlaLeuValMETLeuSerIleLeuSerLeuIleGlyIlePheAsnArgSerPhe
1141 CGAACTGGGATTAAAAGAAGGATCTTATTGTTAACCAAAGTGGCTTATGAAGATATT
ArgThrGlyIleLysArgArgIleLeuLeuLeuIleProLysTrpLeuTyrGluAspIle
1201 CCTAATATGAAAAACAGCAATGTTGTGAAATGCTACAGCCAGGTGTGGTGGTGTGCTCC
ProAsnMETLysAsnSerAsnValValLysMETLeuGlnProGlyValValValCysSer
1261 TGTGATCCCAGCTACTTGGGAAGCTGAAGTAGGAGGACTGC
CysAspProSerTyrLeuGlySer***

☒ 1 3

1 ATGAATCAGGTCACTATTCAATGGGATGCAGTAATAGCCCTTACATACTCTTCAGCTGG
METAsnGlnValThrIleGlnTrpAspAlaValIleAlaLeuTyrIleLeuPheSerTrp
 61 TGTCA~~TGGAGGAATTACA~~AAATATAAACTGCTCTGCCACATCTGGTAGAACAGGCCACA
CysHisGlyGlyIleThrAsnIleAsnCysSerGlyHisIleTrpValGluProAlaThr
 121 ATT~~TTAAGATGGTATGAATATCTCTATATATTG~~CCAAGCAGCAATTAGAAC~~TGCCAA~~
IlePheLysMETGlyMETAsnIleSerIleTyrCysGlnAlaAlaIleLysAsnCysGln
 181 CCAAGGAAACTTCATT~~TTATAAAAATGGCATCAAAGAAAGATT~~CAAATCACAGGATT
ProArgLysLeuHisPheTyrLysAsnGlyIleLysGluArgPheGlnIleThrArgII
 241 AATAAAACAACAGCTCGGCTTGGTATAAAACTTCTGGAAC~~ACCACATGCTTCTATGTAC~~
AsnLysThrThrAlaArgLeuTrpTyrLysAsnPheLeuGluProHisAlaSerMETTyr
 301 TGCACTGCTGAATGT~~CCC~~AAACATT~~TC~~CAAGAGACACTGATATGTGGAAAGACATTCT
CysThrAlaGluCysProLysHisPheGlnGluThrLeuIleCysGlyLysAspIleSer
 361 TCTGGATATCCGCCAGATATT~~CTGATGAA~~GTAACCTGTGT~~CATT~~TATGAATATT~~CAGGC~~
SerGlyTyrProProAspIleProAspGluValThrCysValIleTyrGluTyrSerGly
 421 AACATGACTTGCAC~~TGGAATGCTGG~~AAGCTCACCTACATA~~GACACAA~~TACGTGGTA
AsnMETThrCysThrTrpAsnAlaGlyLysLeuThrTyrIleAspThrLysTyrValVal
 481 CATGTGAAGAGTTAGAGACAGAAGAAGCAACAGTATCTCAC~~CTCAAGCT~~TATATTAAAC
HisValLysSerLeuGluThrGluGluGlnGlnTyrLeuThrSerSerTyrIleAsn
 541 ATCTCCACTGATTCA~~AGGTGG~~CAAGAAGTACTTGGTTGGT~~CCAAGCAG~~AAAC
IleSerThrAspSerLeuGlnGlyGlyLysTyrLeuValTrpValGlnAlaAlaAsn
 601 GCACTAGGCAT~~GGAAAGAGT~~CAAAACA~~ACTG~~CAAATT~~CAC~~CTGGATGATATAGT~~GATA~~CC~~T~~
AlaLeuGlyMETGluGluSerLysGlnLeuGlnIleHisLeuAspAspIleValIlePro
 661 TCTGCAGCCGT~~CATT~~CCAGGGCTGAGACTATAAA~~ATGCTACAGT~~GCCAAGACCATAATT
SerAlaAlaValIleSerArgAlaGluThrIleAsnAlaThrValProLysThrIleIle
 721 TATTGGGATA~~GTCAAACAA~~CAATTGAAAAGGTTCTGT~~GAAT~~GAGATA~~CAAGG~~CTACA
TyrTrpAspSerGlnThrThrIleGluLysValSerCysGluMETArgTyrLysAlaThr
 781 ACAAA~~CCAAACTGGAATGTT~~AAAAGAATTGACACCAATT~~TTACATATGTG~~CAACAGTCA
ThrAsnGlnThrTrpAsnValLysGluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSer
 841 GAATTCTACT~~TGGAGCCAAACATTAAGTACGT~~ATT~~CAAGT~~GAGATGT~~CAAGAA~~ACAGGC
GluPheTyrLeuGluProAsnIleLysTyrValPheGlnValArgCysGlnGluThrGly
 901 AAAAGGTACT~~GGCAGCCTGGAGTT~~ACTGTTTT~~CATAAA~~ACAC~~CTGAA~~ACAG~~TTCCC~~
LysArgTyrTrpGlnProTrpSerSerLeuPh PheHisLysThrProGluThrValPro
 961 CAGGT~~CACATCAAAGCATT~~CCAA~~CATGACACATG~~GAATTCTGGCTAACAG~~TTG~~CTTCC
GlnValThrSerLysAlaPheGlnHisAspThrTrpAsnS rGlyLeuThrValAlaSer
 1021 ATCTCTACAGGGCAC~~TTACTT~~CTGACAACAGAGGAGACATTGGACTTTATTGGGAATG
IleSerThrGlyHisLeuThrSerAspAsnArgGlyAspIleGlyLeuLeuLeuGlyMET

1 4 / 1 4

☒ 1 4

1081 ATCGTCTTGCTGTTATGTTGTCAATTCTTCTTGATTGGATATTAACAGATCATTC
 IleValPheAlaValMetIleSerIleLeuSerLeuIleGlyIlePheAsnArgSerPhe
 1141 CGAACTGGGATTAAAAGAAGGATCTTATTGTTAACCAAAGTGGCTTATGAAGATATT
 ArgThrGlyIleLysArgArgIleLeuLeuLeuIleProLysTrpLeuTyrGluAspIle
 1201 CCTAATATGAAAAACAGCAATGTTGTGAAAATGCTACAGGAAAATAGTGAACCTATGAAT
 ProAsnMETLysAsnSerAsnValValLysMETLeuGlnGluAsnSerGluLeuMETAsn
 1261 AATAATTCCAGTGAGCAGGTCTATATGTTGATCCATGATTACAGAGATAAAAGAAATC
 AsnAsnSerSerGluGlnValLeuTyrValAspProMETileThrGluIleLysGluIle
 1321 TTCATCCCAGAACACAAGCCTACAGACTACAAGAAGGAGAATACAGGACCCCTGGAGACA
 PheIleProGluHisLysProThrAspTyrLysGluAsnThrGlyProLeuGluThr
 1381 AGAGACTACCCGCAAAACTCGCTATTGACAATACTACAGTTGTATATATTCCCTGATCTC
 ArgAspTyrProGlnAsnSerLeuPheAspAsnThrThrValValTyrIleProAspLeu
 1441 AACACTGGATATAAACCCAAATTCAAATTTCTGCCTGAGGGAAGCCATCTCAGTAAT
 AsnThrGlyTyrLysProGlnIleSerAsnPheLeuProGluGlySerHisLeuSerAsn
 1501 AATAATGAAATTACTTCCTAACACTAAACCACCAGTTGATTCCCTTAGACTCAGGAAAT
 AsnAsnGluIleThrSerLeuThrLeuLysProProValAspSerLeuAspSerGlyAsn
 1561 AATCCCAGGTTACAAAGCATTCTAACACTAAACCACCAGTTGATTCCCTTAGACTCAGGAAAT
 AsnProArgLeuGlnLysHisProAsnPheAlaPheSerValSerValAsnSerLeu
 1621 AGCAACACAATATTCTGGAGAATTAAGCCTCATATTAAATCAAGGAGAATGCAGTTCT
 SerAsnThrIlePheLeuGlyGluLeuSerLeuIleLeuAsnGlnGlyGluCysSerSer
 1681 CCTGACATACAAAACTCAGTAGAGGAGGAAACCACCATGCTTTGGAAAATGATTCACCC
 ProAspIleGlnAsnSerValGluGluGluThrThrMETLeuLeuAsnAspSerPro
 1741 AGTGAAACTATTCCAGAACAGACCCTGCTCCTGATGAATTGTCCTGTTGGGGATC
 SerGluThrIleProGluGlnThrLeuLeuProAspGluPheValSerCysLeuGlyIle
 1801 GTGAATGAGGAGTTGCCATCTATTAAACTTATTTCACAAAATATTGGAAAGCCAC
 ValAsnGluGluLeuProSerIleAsnThrTyrPh ProGlnAsnIleLeuGluSerHis
 1861 TTCAATAGGATTCACTCTGGAAAAGTAGAGCTGTGGTCAAAATCAA
 PheAsnArgIleSerLeuLeuGluLys***

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> NOVEL HEMOPOIETIN RECEPTOR GENE, NR12

<130> C2-110DP1PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-273358

<151> 1999-09-27

<150> JP 2000-240397

<151> 2000-08-03

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1784

<212> DNA

<213> Homo sapiens

2/53

<220>

<221> CDS

<222> (98)..(1108)

<400> 1

atgacacacgc caacaagggt ggcagcctgg ctctgaagt gaattatgtg cttcaaacag 60

gttcaaagag ggaaacagt c tttcctgct tccagac atg aat cag gtc act att 115

Met Asn Gln Val Thr Ile

1 5

caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata ctc ttc agc tgg tgt cat 163

Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile Leu Phe Ser Trp Cys His

10 15 20

gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc cac atc tgg gta gaa cca 211

Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly His Ile Trp Val Glu Pro

25 30 35

gcc aca att ttt aag atg ggt gtg aat atc tct ata tat tgc caa gca 259

Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Val Asn Ile Ser Ile Tyr Cys Gln Ala

40 45 50

gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt cat ttt tat aaa aat ggc 307

Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu His Phe Tyr Lys Asn Gly

55 60 65 70

3/53

atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att aat aaa aca aca gct cgg 355

Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile Asn Lys Thr Thr Ala Arg

75

80

85

ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat gct tct atg tac tgc act 403

Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His Ala Ser Met Tyr Cys Thr

90

95

100

gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca ctg ata tgt gga aaa gac 451

Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr Leu Ile Cys Gly Lys Asp

105

110

115

att tct tct gga tat ccg cca gat att cct gat gaa gta acc tgt gtc 499

Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro Asp Glu Val Thr Cys Val

120

125

130

att tat gaa tat tca ggc aac atg act tgc acc tgg aat gct ggg agg 547

Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys Thr Trp Asn Ala Gly Arg

135

140

145

150

ctc acc tac ata gac aca aaa tac gtg gta cat gtg aag agt tta gag 595

Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val His Val Lys Ser Leu Glu

155

160

165

aca gaa gaa gag caa cag tat ctc acc tca agc tat att aac atc tcc 643

4/53

Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser Ser Tyr Ile Asn Ile Ser

170

175

180

act gat tca tta caa ggt ggc aag aag tac ttg gtt tgg gtc caa gca 691

Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr Leu Val Trp Val Gln Ala

185

190

195

gca aac gca cta ggc atg gaa gag tca aaa caa ctg caa att cac ctg 739

Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys Gln Leu Gln Ile His Leu

200

205

210

gat gat ata gtg ata ctt tct gca gcc gtc att tcc agg gct gag act 787

Asp Asp Ile Val Ile Leu Ser Ala Ala Val Ile Ser Arg Ala Glu Thr

215

220

225

230

ata aat gct aca gtg ccc aag acc ata att tat tgg gat agt caa aca 835

Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile Tyr Trp Asp Ser Gln Thr

235

240

245

aca att gaa aag gtt tcc tgt gaa atg aga tac aag gct aca aca aac 883

Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg Tyr Lys Ala Thr Thr Asn

250

255

260

caa act tgg aat gtt aaa gaa ttt gac acc aat ttt aca tat gtg caa 931

Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr Asn Phe Thr Tyr Val Gln

265

270

275

5/53

cag tca gaa ttc tac ttg gag cca aac att aag tac gta ttt caa gtg 979
Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile Lys Tyr Val Phe Gln Val
280 285 290

aga tgt caa gaa aca ggc aaa agg tac tgg cag cct tgg agt tca ctg 1027
Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp Gln Pro Trp Ser Ser Leu
295 300 305 310

ttt ttt cat aaa aca cct gaa aca ggt gag tgt act tat ata ttt tat 1075
Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Gly Glu Cys Thr Tyr Ile Phe Tyr
315 320 325

tct gtt ggg ctt ttc ttt ata tat ctt ttc tgc tgagcacagt ggctcacgcc 1128
Ser Val Gly Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Phe Cys
330 335

tgtaattcca gcactttgag aggccaaggc aggaagattg cttagcccta ggagttgag 1188
actggcctgg gcaacatggt gagaccctag tctgtacaga aaaataataa ttattattag 1248

cctgggtggt ggaatgcatt tgttagtcga gctacttggg aggctgaggt agtaggattg 1308

cgtgagcccg ggagttgat gctgcagtga gctatgatca tcccactgct ctctagcctg 1368

gaggaaaagac caagaccctg tttcctaaaa agtttaaac agccaggtgc agtggcttat 1428

6/53

gtctgtaatc ccagcactt gggaggccaa ggtgggtgga ttaccttagg tcaggacttc 1488

aagacacctt cggccgacat ggtgaaaccc tgtctctact aaaaatacga aaattagctg 1548

ggcatggtgg caggtgcctg taatctcagc tactcgaaag gctgaggcag gaaaattgct 1608

tgaacccaag aagtggaggt tgcatgtaac tgagattgta ccaccgcact ccagcctggc 1668

caagagagag agacttggtc tcaaaaaaaaaa ataaaaataaa aaataataat aataaataag 1728

ttaaaaaacaa aataaagcta caagataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1784

<210> 2

<211> 337

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile

1

5

10

15

Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly

20

25

30

7/53

His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Val Asn Ile

35

40

45

Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu

50

55

60

His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile

65

70

75

80

Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His

85

90

95

Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr

100

105

110

Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro

115

120

125

Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys

130

135

140

Thr Trp Asn Ala Gly Arg Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val

145

150

155

160

His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser

165

170

175

8/53

Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr

180

185

190

Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys

195

200

205

Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Leu Ser Ala Ala Val

210

215

220

Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile

225

230

235

240

Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg

245

250

255

Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr

260

265

270

Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile

275

280

285

Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp

290

295

300

Gln Pro Trp Ser Ser Leu Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Gly Glu

9/53

305 310 315 320

Cys Thr Tyr Ile Phe Tyr Ser Val Gly Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Phe

325 330 335

Cys

<210> 3

<211> 1479

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (98)..(1381)

<400> 3

atgacacacgc caacaagggt ggcagcctgg ctctgaagtg gaattatgtg cttcaaacag 60

gttgaaagag ggaaacagtc ttttcttgct tccagac atg aat cag gtc act att 115

Met Asn Gln Val Thr Ile

1

5

caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata ctc ttc agc tgg tgt cat 163

10/53

Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile Leu Phe Ser Trp Cys His

10

15

20

gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc cac atc tgg gta gaa cca 211

Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly His Ile Trp Val Glu Pro

25

30

35

gcc aca att ttt aag atg ggt gtg aat atc tct ata tat tgc caa gca 259

Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Val Asn Ile Ser Ile Tyr Cys Gln Ala

40

45

50

gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt cat ttt tat aaa aat ggc 307

Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu His Phe Tyr Lys Asn Gly

55

60

65

70

atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att aat aaa aca aca gct cgg 355

Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile Asn Lys Thr Thr Ala Arg

75

80

85

ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat gct tct atg tac tgc act 403

Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His Ala Ser Met Tyr Cys Thr

90

95

100

gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca ctg ata tgt gga aaa gac 451

Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr Leu Ile Cys Gly Lys Asp

105

110

115

11/53

att tct tct gga tat ccg cca gat att cct gat gaa gta acc tgt gtc 499
Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro Asp Glu Val Thr Cys Val
120 125 130

att tat gaa tat tca ggc aac atg act tgc acc tgg aat gct ggg agg 547
Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys Thr Trp Asn Ala Gly Arg
135 140 145 150

ctc acc tac ata gac aca aaa tac gtg gta cat gtg aag agt tta gag 595
Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val His Val Lys Ser Leu Glu
155 160 165

aca gaa gaa gag caa cag tat ctc acc tca agc tat att aac atc tcc 643
Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser Ser Tyr Ile Asn Ile Ser
170 175 180

act gat tca tta caa ggt ggc aag aag tac ttg gtt tgg gtc caa gca 691
Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Tyr Leu Val Trp Val Gln Ala
185 190 195

gca aac gca cta ggc atg gaa gag tca aaa caa ctg caa att cac ctg 739
Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys Gln Leu Gln Ile His Leu
200 205 210

gat gat ata gtg ata ctt tct gca gcc gtc att tcc agg gct gag act 787

12/53

Asp Asp Ile Val Ile Leu Ser Ala Ala Val Ile Ser Arg Ala Glu Thr

215

220

225

230

ata aat gct aca gtg ccc aag acc ata att tat tgg gat agt caa aca 835

Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile Tyr Trp Asp Ser Gln Thr

235

240

245

aca att gaa aag gtt tcc tgt gaa atg aga tac aag gct aca aca aac 883

Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg Tyr Lys Ala Thr Thr Asn

250

255

260

caa act tgg aat gtt aaa gaa ttt gac acc aat ttt aca tat gtg caa 931

Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr Asn Phe Thr Tyr Val Gln

265

270

275

cag tca gaa ttc tac ttg gag cca aac att aag tac gta ttt caa gtg 979

Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile Lys Tyr Val Phe Gln Val

280

285

290

aga tgt caa gaa aca ggc aaa agg tac tgg cag cct tgg agt tca ctg 1027

Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp Gln Pro Trp Ser Ser Leu

295

300

305

310

ttt ttt cat aaa aca cct gaa aca gtt ccc cag gtc aca tca aaa gca 1075

Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro Gln Val Thr Ser Lys Ala

315

320

325

13/53

ttc caa cat gac aca tgg aat tct ggg cta aca gtt gct tcc atc tct 1123
Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu Thr Val Ala Ser Ile Ser
330 335 340

aca ggg cac ctt act tct gac aac aga gga gac att gga ctt tta ttg 1171
Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly Asp Ile Gly Leu Leu Leu
345 350 355

gga atg atc gtc ttt gct gtt atg ttg tca att ctt tct ttg att ggg 1219
Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser Ile Leu Ser Leu Ile Gly
360 365 370

ata ttt aac aga tca ttc cga act ggg att aaa aga agg atc tta ttg 1267
Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile Lys Arg Arg Ile Leu Leu
375 380 385 390

tta ata cca aag tgg ctt tat gaa gat att cct aat atg aaa aac agc 1315
Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile Pro Asn Met Lys Asn Ser
395 400 405

aat gtt gtg aaa atg cta cag cca ggt gtg gtg tgc tcc tgt gat 1363
Asn Val Val Lys Met Leu Gln Pro Gly Val Val Val Cys Ser Cys Asp
410 415 420

ccc agc tac ttg gga agc tgaagtagga ggactgcttg agcccaggag 1411

14/53

Pro Ser Tyr Leu Gly Ser

425

tccaaacacca gcttcacaac ataccaagac cctgtctcaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa 1471

aaaaaaaaa

1479

<210> 4

<211> 428

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile

1

5

10

15

Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly

20

25

30

His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Val Asn Ile

35

40

45

Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu

50

55

60

15/53

His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile

65 70 75 80

Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His

85 90 95

Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr

100 105 110

Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro

115 120 125

Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys

130 135 140

Thr Trp Asn Ala Gly Arg Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val

145 150 155 160

His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser

165 170 175

Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr

180 185 190

Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys

195 200 205

16/53

Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Leu Ser Ala Ala Val

210

215

220

Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile

225

230

235

240

Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg

245

250

255

Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr

260

265

270

Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile

275

280

285

Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp

290

295

300

Gln Pro Trp Ser Ser Leu Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro

305

310

315

320

Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu

325

330

335

Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly

17/53

340

345

350

Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser

355

360

365

Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile

370

375

380

Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile

385

390

395

400

Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Pro Gly Val

405

410

415

Val Val Cys Ser Cys Asp Pro Ser Tyr Leu Gly Ser

420

425

<210> 5

<211> 2123

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (98)..(1984)

18/53

<400> 5

atgacacagc caacaagggt ggcagcctgg ctctgaagtg gaattatgtg cttcaaacag 60

gtt gaaagag ggaaacagtc tttcctgct tccagac atg aat cag gtc act att 115

Met Asn Gln Val Thr Ile

1 5

caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata ctc ttc agc tgg tgt cat 163

Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile Leu Phe Ser Trp Cys His

10 15 20

gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc cac atc tgg gta gaa cca 211

Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly His Ile Trp Val Glu Pro

25 30 35

gcc aca att ttt aag atg ggt gtg aat atc tct ata tat tgc caa gca 259

Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Val Asn Ile Ser Ile Tyr Cys Gln Ala

40 45 50

gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt cat ttt tat aaa aat ggc 307

Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu His Phe Tyr Lys Asn Gly

55 60 65 70

atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att aat aaa aca aca gct cgg 355

Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile Asn Lys Thr Thr Ala Arg

19/53

75

80

85

ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat gct tct atg tac tgc act 403

Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His Ala Ser Met Tyr Cys Thr

90

95

100

gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca ctg ata tgt gga aaa gac 451

Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr Leu Ile Cys Gly Lys Asp

105

110

115

att tct tct gga tat ccg cca gat att cct gat gaa gta acc tgt gtc 499

Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro Asp Glu Val Thr Cys Val

120

125

130

att tat gaa tat tca ggc aac atg act tgc acc tgg aat gct ggg agg 547

Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys Thr Trp Asn Ala Gly Arg

135

140

145

150

ctc acc tac ata gac aca aaa tac gtg gta cat gtg aag agt tta gag 595

Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val His Val Lys Ser Leu Glu

155

160

165

aca gaa gaa gag caa cag tat ctc acc tca agc tat att aac atc tcc 643

Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser Ser Tyr Ile Asn Ile Ser

170

175

180

20/53

act gat tca tta caa ggt ggc aag aag tac ttg gtt tgg gtc caa gca 691
Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr Leu Val Trp Val Gln Ala
185 190 195

gca aac gca cta ggc atg gaa gag tca aaa caa ctg caa att cac ctg 739
Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys Gln Leu Gln Ile His Leu
200 205 210

gat gat ata gtg ata ctt tct gca gcc gtc att tcc agg gct gag act 787
Asp Asp Ile Val Ile Leu Ser Ala Ala Val Ile Ser Arg Ala Glu Thr
215 220 225 230

ata aat gct aca gtg ccc aag acc ata att tat tgg gat agt caa aca 835
Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile Tyr Trp Asp Ser Gln Thr
235 240 245

aca att gaa aag gtt tcc tgt gaa atg aga tac aag gct aca aca aac 883
Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg Tyr Lys Ala Thr Thr Asn
250 255 260

caa act tgg aat gtt aaa gaa ttt gac acc aat ttt aca tat gtg caa 931
Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr Asn Phe Thr Tyr Val Gln
265 270 275

cag tca gaa ttc tac ttg gag cca aac att aag tac gta ttt caa gtg 979
Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile Lys Tyr Val Phe Gln Val

21/53

280

285

290

aga tgt caa gaa aca ggc aaa agg tac tgg cag cct tgg agt tca ctg 1027

Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp Gln Pro Trp Ser Ser Leu

295

300

305

310

ttt ttt cat aaa aca cct gaa aca gtt ccc cag gtc aca tca aaa gca 1075

Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro Gln Val Thr Ser Lys Ala

315

320

325

ttc caa cat gac aca tgg aat tct ggg cta aca gtt gct tcc atc tct 1123

Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu Thr Val Ala Ser Ile Ser

330

335

340

aca ggg cac ctt act tct gac aac aga gga gac att gga ctt tta ttg 1171

Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly Asp Ile Gly Leu Leu Leu

345

350

355

gga atg atc gtc ttt gct gtt atg ttg tca att ctt tct ttg att ggg 1219

Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser Ile Leu Ser Leu Ile Gly

360

365

370

aca ttt aac aga tca ttc cga act ggg att aaa aga agg atc tta ttg 1267

Thr Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile Lys Arg Arg Ile Leu Leu

375

380

385

390

22/53

tta ata cca aag tgg ctt tat gaa gat att cct aat atg aaa aac agc 1315
Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile Pro Asn Met Lys Asn Ser

395 400 405

aat gtt gtg aaa atg cta cag gaa aat agt gaa ctt atg aat aat aat 1363
Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser Glu Leu Met Asn Asn Asn
410 415 420

tcc agt gag cag gtc cta tat gtt gat ccc atg att aca gag ata aaa 1411
Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro Met Ile Thr Glu Ile Lys
425 430 435

gaa atc ttc atc cca gaa cac aag cct aca gac tac aag aag gag aat 1459
Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr Asp Tyr Lys Lys Glu Asn
440 445 450

aca gga ccc ctg gag aca aga gac tac ccg caa aac tcg cta ttc gac 1507
Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro Gln Asn Ser Leu Phe Asp
455 460 465 470

aat act aca gtt gta tat att cct gat ctc aac act gga tat aaa ccc 1555
Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu Asn Thr Gly Tyr Lys Pro
475 480 485

caa att tca aat ttt ctg cct gag gga agc cat ctc agt aat aat aat 1603
Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser His Leu Ser Asn Asn Asn

23/53

490

495

500

gaa att act tcc tta aca ctt aaa cca cca gtt gat tcc tta gac tca 1651

Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro Val Asp Ser Leu Asp Ser

505

510

515

gga aat aat ccc agg tta caa aag cat cct aat ttt gct ttt tct gtt 1699

Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro Asn Phe Ala Phe Ser Val

520

525

530

tca agt gtg aat tca cta agc aac aca ata ttt ctt gga gaa tta agc 1747

Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile Phe Leu Gly Glu Leu Ser

535

540

545

550

ctc ata tta aat caa gga gaa tgc agt tct cct gac ata caa aac tca 1795

Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser Pro Asp Ile Gln Asn Ser

555

560

565

gta gag gag gaa acc acc atg ctt ttg gaa aat gat tca ccc agt gaa 1843

Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu Asn Asp Ser Pro Ser Glu

570

575

580

act att cca gaa cag acc ctg ctt cct gat gaa ttt gtc tcc tgt ttg 1891

Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp Glu Phe Val Ser Cys Leu

585

590

595

24/53

ggg atc gtg aat gag gag ttg cca tct att aat act tat ttt cca caa 1939

Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gln

600

605

610

aat att ttg gaa agc cac ttc aat agg att tca ctc ttg gaa aag 1984

Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile Ser Leu Leu Glu Lys

615

620

625

tagagctgtg tggtcaaaaat caatatgaga aagctgcctt gcaatctgaa cttgggtttt 2044

ccctgcaata gaaattgaat tctgcctt tttaaaaaaa atgtattcac atccaaaaaa 2104

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

2123

<210> 6

<211> 629

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile

1

5

10

15

Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly

20

25

30

25/53

His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Val Asn Ile

35 40 45

Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu

50 55 60

His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile

65 70 75 80

Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His

85 90 95

Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr

100 105 110

Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro

115 120 125

Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys

130 135 140

Thr Trp Asn Ala Gly Arg Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val

145 150 155 160

His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser

26/53

165

170

175

Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr

180

185

190

Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys

195

200

205

Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Leu Ser Ala Ala Val

210

215

220

Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile

225

230

235

240

Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg

245

250

255

Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr

260

265

270

Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile

275

280

285

Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp

290

295

300

27/53

Gln Pro Trp Ser Ser Leu Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro

305 310 315 320

Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu

325 330 335

Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly

340 345 350

Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser

355 360 365

Ile Leu Ser Leu Ile Gly Thr Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile

370 375 380

Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile

385 390 395 400

Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser

405 410 415

Glu Leu Met Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro

420 425 430

Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr

435 440 445

28/53

Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro

450

455

460

Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu

465

470

475

480

Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser

485

490

495

His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro

500

505

510

Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro

515

520

525

Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile

530

535

540

Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser

545

550

555

560

Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu

565

570

575

Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp

29/53

580

585

590

Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile

595

600

605

Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile

610

615

620

Ser Leu Leu Glu Lys

625

<210> 7

<211> 1301

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1284)

<400> 7

atg aat cag gtc act att caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata 48

Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile

1

5

10

15

30/53

ctc ttc agc tgg tgt cat gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc 96

Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly

20

25

30

cac atc tgg gta gaa cca gcc aca att ttt aag atg ggt atg aat atc 144

His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile

35

40

45

tct ata tat tgc caa gca gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt 192

Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu

50

55

60

cat ttt tat aaa aat ggc atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att 240

His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile

65

70

75

80

aat aaa aca aca gct cgg ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat 288

Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His

85

90

95

gct tct atg tac tgc act gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca 336

Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr

100

105

110

ctg ata tgt gga aaa gac att tct tct gga tat ccg cca gat att cct 384

Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro

31/53

115

120

125

gat gaa gta acc tgt gtc att tat gaa tat tca ggc aac atg act tgc 432

Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys

130

135

140

acc tgg aat gct ggg aag ctc acc tac ata gac aca aaa tac gtg gta 480

Thr Trp Asn Ala Gly Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val

145

150

155

160

cat gtg aag agt tta gag aca gaa gaa gag caa cag tat ctc acc tca 528

His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser

165

170

175

agc tat att aac atc tcc act gat tca tta caa ggt ggc aag aag tac 576

Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Lys Tyr

180

185

190

ttg gtt tgg gtc caa gca gca aac gca cta ggc atg gaa gag tca aaa 624

Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys

195

200

205

caa ctg caa att cac ctg gat gat ata gtg ata cct tct gca gcc gtc 672

Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val

210

215

220

32/53

att tcc agg gct gag act ata aat gct aca gtg ccc aag acc ata att 720

Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile

225 230 235 240

tat tgg gat agt caa aca aca att gaa aag gtt tcc tgt gaa atg aga 768

Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg

245 250 255

tac aag gct aca aca aac caa act tgg aat gtt aaa gaa ttt gac acc 816

Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr

260 265 270

aat ttt aca tat gtg caa cag tca gaa ttc tac ttg gag cca aac att 864

Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile

275 280 285

aag tac gta ttt caa gtg aga tgt caa gaa aca ggc aaa agg tac tgg 912

Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp

290 295 300

cag cct tgg agt tca ctg ttt ttt cat aaa aca cct gaa aca gtt ccc 960

Gln Pro Trp Ser Ser Leu Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro

305 310 315 320

cag gtc aca tca aaa gca ttc caa cat gac aca tgg aat tct ggg cta 1008

Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu

33/53

325

330

335

aca gtt gct tcc atc tct aca ggg cac ctt act tct gac aac aga gga 1056
Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly

340

345

350

gac att gga ctt tta ttg gga atg atc gtc ttt gct gtt atg ttg tca 1104
Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser

355

360

365

att ctt tct ttg att ggg ata ttt aac aga tca ttc cga act ggg att 1152
Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile

370

375

380

aaa aga agg atc tta ttg tta ata cca aag tgg ctt tat gaa gat att 1200
Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile
385 390 395 400

cct aat atg aaa aac agc aat gtt gtg aaa atg cta cag cca ggt gtg 1248
Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Pro Gly Val

405

410

415

gtg gtg tgc tcc tgt gat ccc agc tac ttg gga agc tgaagttagga 1294
Val Val Cys Ser Cys Asp Pro Ser Tyr Leu Gly Ser

420

425

34/53

ggactgc

1301

<210> 8

<211> 428

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile

1

5

10

15

Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly

20

25

30

His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile

35

40

45

Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu

50

55

60

His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile

65

70

75

80

Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His

85

90

95

35/53

Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr

100

105

110

Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro

115

120

125

Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys

130

135

140

Thr Trp Asn Ala Gly Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val

145

150

155

160

His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser

165

170

175

Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr

180

185

190

Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys

195

200

205

Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val

210

215

220

Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile

36/53

225

230

235

240

Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg

245

250

255

Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr

260

265

270

Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile

275

280

285

Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp

290

295

300

Gln Pro Trp Ser Ser Leu Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro

305

310

315

320

Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu

325

330

335

Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly

340

345

350

Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser

355

360

365

37/53

Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile

370

375

380

Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile

385

390

395

400

Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Pro Gly Val

405

410

415

Val Val Cys Ser Cys Asp Pro Ser Tyr Leu Gly Ser

420

425

<210> 9

<211> 1910

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1887)

<400> 9

atg aat cag gtc act att caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata 48

Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile

38/53

ctc ttc agc tgg tgt cat gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc 96
Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly

20

25

30

cac atc tgg gta gaa cca gcc aca att ttt aag atg ggt atg aat atc 144
His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile

35

40

45

tct ata tat tgc caa gca gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt 192
Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu

50

55

60

cat ttt tat aaa aat ggc atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att 240
His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile
65 70 75 80

aat aaa aca aca gct cgg ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat 288
Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His

85

90

95

gct tct atg tac tgc act gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca 336
Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr
100 105 110

ctg ata tgt gga aaa gac att tct tct gga tat ccg cca gat att cct 384

39/53

Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro

115

120

125

gat gaa gta acc tgt gtc att tat gaa tat tca ggc aac atg act tgc 432
Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys

130

135

140

acc tgg aat gct ggg aag ctc acc tac ata gac aca aaa tac gtg gta 480
Thr Trp Asn Ala Gly Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val
145 150 155 160

cat gtg aag agt tta gag aca gaa gaa gag caa cag tat ctc acc tca 528
His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser
165 170 175

agc tat att aac atc tcc act gat tca tta caa ggt ggc aag aag tac 576
Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Lys Lys Tyr
180 185 190

ttg gtt tgg gtc caa gca gca aac gca cta ggc atg gaa gag tca aaa 624
Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys
195 200 205

caa ctg caa att cac ctg gat gat ata gtg ata cct tct gca gcc gtc 672
Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val
210 215 220

40/53

att tcc agg gct gag act ata aat gct aca gtg ccc aag acc ata att 720
Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile
225 230 235 240

tat tgg gat agt caa aca aca att gaa aag gtt tcc tgt gaa atg aga 768
Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg
245 250 255

tac aag gct aca aca aac caa act tgg aat gtt aaa gaa ttt gac acc 816
Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr
260 265 270

aat ttt aca tat gtg caa cag tca gaa ttc tac ttg gag cca aac att 864
Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile
275 280 285

aag tac gta ttt caa gtg aga tgt caa gaa aca ggc aaa agg tac tgg 912
Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp
290 295 300

cag cct tgg agt tca ctg ttt ttt cat aaa aca cct gaa aca gtt ccc 960
Gln Pro Trp Ser Ser Leu Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro
305 310 315 320

cag gtc aca tca aaa gca ttc caa cat gac aca tgg aat tct ggg cta 1008

41/53

Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu

325

330

335

aca gtt gct tcc atc tct aca ggg cac ctt act tct gac aac aga gga 1056

Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly

340

345

350

gac att gga ctt tta ttg gga atg atc gtc ttt gct gtt atg ttg tca 1104

Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser

355

360

365

att ctt tct ttg att ggg ata ttt aac aga tca ttc cga act ggg att 1152

Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile

370

375

380

aaa aga agg atc tta ttg tta ata cca aag tgg ctt tat gaa gat att 1200

Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile

385

390

395

400

cct aat atg aaa aac agc aat gtt gtg aaa atg cta cag gaa aat agt 1248

Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser

405

410

415

gaa ctt atg aat aat aat tcc agt gag cag gtc cta tat gtt gat ccc 1296

Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro

420

425

430

42/53

atg att aca gag ata aaa gaa atc ttc atc cca gaa cac aag cct aca 1344
Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr
435 440 445

gac tac aag aag gag aat aca gga ccc ctg gag aca aga gac tac ccg 1392
Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro
450 455 460

caa aac tcg cta ttc gac aat act aca gtt gta tat att cct gat ctc 1440
Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu
465 470 475 480

aac act gga tat aaa ccc caa att tca aat ttt ctg cct gag gga agc 1488
Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser
485 490 495

cat ctc agt aat aat aat gaa att act tcc tta aca ctt aaa cca cca 1536
His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro
500 505 510

gtt gat tcc tta gac tca gga aat aat ccc agg tta caa aag cat cct 1584
Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro
515 520 525

aat ttt gct ttt tct gtt tca agt gtg aat tca cta agc aac aca ata 1632

43/53

Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile

530

535

540

ttt ctt gga gaa tta agc ctc ata tta aat caa gga gaa tgc agt tct 1680

Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser

545

550

555

560

cct gac ata caa aac tca gta gag gag gaa acc acc atg ctt ttg gaa 1728

Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu

565

570

575

aat gat tca ccc agt gaa act att cca gaa cag acc ctg ctt cct gat 1776

Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp

580

585

590

gaa ttt gtc tcc tgt ttg ggg atc gtg aat gag gag ttg cca tct att 1824

Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile

595

600

605

aat act tat ttt cca caa aat att ttg gaa agc cac ttc aat agg att 1872

Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile

610

615

620

tca ctc ttg gaa aag tagagctgtg tggtcaaaat caa 1910

Ser Leu Leu Glu Lys

625

44/53

<210> 10

<211> 629

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile
1 5 10 15

Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly
20 25 30

His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile
35 40 45

Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu
50 55 60

His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile
65 70 75 80

Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His
85 90 95

45/53

Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr

100

105

110

Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro

115

120

125

Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys

130

135

140

Thr Trp Asn Ala Gly Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val

145

150

155

160

His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser

165

170

175

Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr

180

185

190

Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys

195

200

205

Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val

210

215

220

Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile

225

230

235

240

46/53

Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg

245

250

255

Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr

260

265

270

Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile

275

280

285

Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp

290

295

300

Gln Pro Trp Ser Ser Leu Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro

305

310

315

320

Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu

325

330

335

Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly

340

345

350

Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser

355

360

365

Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile

47/53

370

375

380

Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile

385

390

395

400

Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser

405

410

415

Glu Leu Met Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro

420

425

430

Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr

435

440

445

Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro

450

455

460

Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu

465

470

475

480

Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser

485

490

495

His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro

500

505

510

48/53

Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro

515 520 525

Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile

530 535 540

Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser

545 550 555 560

Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu

565 570 575

Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp

580 585 590

Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile

595 600 605

Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile

610 615 620

Ser Leu Leu Glu Lys

625

49/53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequecne

<400> 11

gcaacagtca gaattctact tggagcc

27

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequecne

<400> 12

cattaagtac gtattfcaag tgagatgtc

29

<210> 13

50/53

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

ggtactggca gccttggagt tcactg

26

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

cagtgaactc caaggctgcc agtacc

26

<210> 15

51/53

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequecne

<400> 15

gacatctcac ttgaaaatacg tacttaatg

29

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequecne

<400> 16

ggctccaagt agaattctga ctgttg

27

<210> 17

52/53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequecne

<400> 17

ccgcccagata ttcctgtatga agtaacc

27

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequecne

<400> 18

atgaatcagg tcactattca atgg

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequecne

<400> 19

gcagtccctcc tacttcagct tccc

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequecne

<400> 20

ttgattttga ccacacagct ctac.

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06654

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, 1/21, 5/10, C07K 14/715, 16/28, C12P 21/02, G01N 33/567

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, JICST

FILE (JOIS)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Gerold Bepler et al., "A 1.4-Mb High-Resolution Physical Map and Contig of Chromosome Segment 11p15.5 and Genes in the LOH11A Metastasis Suppressor Region.", Genomics (15 January, 1999) Vol.55, No.2, pp.164-175 & GenBank Accession No.AF102051	8
A	Mikiyoshi Saito et al., "Molecular Cloning of a Murine IL-6 Receptor-associated Signal Transducer, gp130, and its Regulated Expression in vivo.", The Journal of Immunology (15 June, 1992) Vol.148, No.12, pp.4066-4071	1-9
A	WO, 97/07215, A1 (MEDVET SCIENCE PTY, LTD.), 27 February, 1997 (27.02.97) & AU, 9666969, A & GB, 2319034, A	1-9
A	W. S. Alexander et al., "Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6.", Current Biology (03 June, 1999) Vol.9, No.11, pp.605-608	1-9
A	Timothy Gainsford et al., "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional	1-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 December, 2000 (18.12.00)Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06654

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	activation of hemopoietic cells.", Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (10 December, 1996) Vol.93, No.25, pp.14564-14568	
A	Douglas J. Hilton et al., "Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor.", Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (09 January, 1996) Vol.93, No.1, pp.497-501	1-9
A	Lorraine Robb et al., "Structural Analysis of the Gene Encoding the Murine Interleukin-11 Receptor α -Chain and a Related Locus.", The Journal of Biological Chemistry (07 June, 1996) Vol.271, No.23, pp.13754-13761	1-9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/06654

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N 15/12, 1/21, 5/10, C07K 14/715, 16/28, C12P 21/02, G01N 33/567

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), REGISTRY(STN), WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル(JOIS)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Gerold Bepler et al. "A 1.4-Mb High-Resolution Physical Map and Contig of Chromosome Segment 11p15.5 and Genes in the LOH11A Metastasis Suppressor Region.", Genomics (Jan. 15, 1999) Vol. 55, No. 2, p. 164-175 & GenBank Accession No. AF102051	8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 18. 12. 00	国際調査報告の発送日 26.12.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 内田 俊生 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) 関連すると認められる文献	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*		
A	Mikiyoshi Saito et al. "Molecular Cloning of a Murine IL-6 Receptor-associated Signal Transducer, gp130, and its Regulated Expression in vivo.", The Journal of Immunology (Jun. 15, 1992) Vol. 148, No. 12, p. 4066-4071	1-9
A	WO, 97/07215, A1 (MEDVET SCIENCE PTY, LTD.) 27.2月.1997(27.02.97) & AU, 9666969, A & GB, 2319034, A	1-9
A	W. S. Alexander et al. "Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6.", Current Biology (Jun. 3, 1999) Vol. 9, No. 11, p. 605-608	1-9
A	Timothy Gainsford et al. "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells.", Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (Dec. 10, 1996) Vol. 93, No. 25, p. 14564-14568	1-9
A	Douglas J. Hilton et al. "Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor.", Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (Jan. 9, 1996) Vol. 93, No. 1, p. 497-501	1-9
A	Lorraine Robb et al. "Structural Analysis of the Gene Encoding the Murine Interleukin-11 Receptor α -Chain and a Related Locus.", The Journal of Biological Chemistry (Jun. 7, 1996) Vol. 271, No. 23, p. 13754-13761	1-9

DESCRIPTION

NOVEL HEMOPOIETIN RECEPTOR PROTEIN, NR12

5 Technical Field

The present invention relates to novel hemopoietin receptor proteins, and genes encoding them, as well as methods for producing and using the same.

10 Background Art

A large number of cytokines are known as humoral factors that regulate proliferation/differentiation of various cells, or that regulate the maintenance, activation, and death of differentiated mature cells. There are specific receptors for these cytokines, which 15 are categorized into several families based on their structural similarities (Hilton D.J., in "Guidebook to Cytokines and Their Receptors" edited by Nicola N.A. (A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press), 1994, p8-16).

On the other hand, as compared to the similarities of their 20 receptors, the homology of the primary-structure among cytokines is quite low. No significant amino acid homology has been observed, even among cytokine members that belong to the same receptor family. This explains the functional specificity of respective cytokines, as well as similarities among cellular reactions induced by each cytokine.

25 Representative examples of the above-mentioned receptor families are the tyrosine kinase receptor family, hemopoietin receptor family, tumor necrosis factor (TNF) receptor family, and transforming growth factor (TGF) receptor family. Different signal transduction pathways have been reported to be involved with each of these families. Among 30 these receptor families, many receptors of the hemopoietin receptor family in particular are expressed in blood cells and immunocytes, and their ligands, cytokines, are often termed as hemopoietic factors or interleukins. Some of these hemopoietic factors or interleukins exist within blood and are thought to be involved in systemic humoral 35 regulation of hemopoietic or immune functions.

This contrasts with the belief that cytokines belonging to other

families are often involved in only topical regulation. Some of these hemopoietins can be taken as hormone-like factors, and representative peptide hormones, such as the growth hormone, prolactin, or leptin receptors, also belong to the hemopoietin receptor family. Because 5 of these hormone-like systemic regulatory features, it is anticipated that administration of these hemopoietins can be applied to the treatment of various diseases. Among the large number of cytokines known, those that are presently being clinically applied include erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, and IL-2. Combined with IL-11, LIF, 10 and IL-12 that are currently under consideration for clinical trials, and the above-mentioned peptide hormones, such as the growth hormone and prolactin, it can be envisaged that by searching novel cytokines that bind to hemopoietin receptors among the above-mentioned various receptor superfamilies, it is possible to find a cytokine that can 15 be clinically applied with a higher efficiency.

As mentioned above, cytokine receptors have structural similarities among the family members. Using these similarities, many investigations are aimed at finding novel receptors. In particular, many receptors of the tyrosine kinase receptor family have already 20 been cloned, using its highly conserved sequence at the catalytic site (Matthews W. et al., Cell, 1991, 65 (7) p1143-52). In comparison, hemopoietin receptors do not have a tyrosine kinase-like enzyme activity domain in their cytoplasmic regions, and their signal transductions are known to be mediated through associations with other 25 tyrosine kinase proteins existing freely in the cytoplasm. Though the sites on receptors binding with these cytoplasmic tyrosine kinases, called JAK kinases group, are conserved among family members, the homology is not very high (Murakami M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, p11349-11353).. Actually, the sequence that best 30 characterizes these hemopoietin receptors exists in the extracellular region. In particular, a five amino acid motif, Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser (wherein "Xaa" is an arbitrary amino acid), is conserved in almost all of the hemopoietin receptors. Therefore, novel receptors may be obtained by searching for novel family members using this motif sequence. 35 In fact, these approaches have already led to the identification of the IL-11 receptor (Robb, L. et al., J. Biol. Chem., 1996, 271 (23)

13754-13761), the leptin receptor (Gainsford T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93 (25) p14564-8), and the IL-13 receptor (Hilton D.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93 (1) p497-501).

5 Disclosure of the Invention

The present invention provides novel hemopoietin receptor proteins, and DNA encoding these proteins. The present invention also provides a vector into which the DNA has been inserted, a transformant harboring the DNA, and a method for producing recombinant proteins 10 using the transformant. The present invention also provides methods of screening for compounds that bind to the protein.

Initially, the inventors attempted to find a novel receptor using oligonucleotides encoding the Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser motif (WS motif) as the probe by the plaque hybridization method, RT-PCR method, and 15 so on. However, it was extremely difficult to strictly select only those to which all 15 nucleotides that encode the motif would completely hybridize under the usual hybridization conditions, because the oligonucleotide "tggag(t/c)nnntggag(t/c)" (wherein "n" is an arbitrary nucleotide) encoding the motif was short, having just 15 20 base pairs. Further, because the g/c content of the oligonucleotide was high, higher than usual annealing temperature conditions were required to strictly select those sequences in which all the 15 nucleotides hybridized completely to the oligonucleotide. Therefore, performing screening under normal hybridization experiment conditions 25 was extremely difficult.

To solve these problems, the inventors searched for additional motifs, other than the site of the above-mentioned WS motif that is conserved in the hemopoietin receptor family. The inventors found that a residue, either tyrosine or histidine, located 13 to 27 amino acids upstream of the WS motif in the extracellular region was highly 30 conserved in the receptor family. Furthermore, additional search for consensus sequences that are frequently found in the 6 amino acids from the above Tyr/His residue toward the C-terminus led to the identification of the following consensus sequence:
35 (Tyr/His)-Xaa-(Hydrophobic/Ala)-(Gln/Arg)-Hydrophobic-Arg
(hereinafter, abbreviated as the YR motif). However, this YR motif

is not exactly a perfect consensus sequence, and the combination of the nucleotide sequences that encode the motif is very complicated. Therefore, it is practically impossible to synthesize and provide oligonucleotides that encode all of the amino acid sequences as probes
5 for hybridization, which is a practical method for screening, or as primers aimed for RT-PCR.

Accordingly, the inventors looked for other approaches to practically search for novel members of the hemopoietin receptor family using the above two motifs as probes, and determined that it would
10 be appropriate to perform a database search on the computer using partial amino acid sequences of known hemopoietin receptors, including both motifs as the query. The inventors repeated TblastN searches on the gss and htgs database in GenBank, using partial amino acid sequences from multiple known hemopoietin receptors as the query.
15 As a result, many positive clones, including known hemopoietin receptors, were obtained in all cases. Next, the nucleotide sequence around those sequences which seemed to be positive at a high rate was converted to the amino acid sequence. Genes considered to encode members of the receptor family were selected by BlastX search, in
20 which the amino acid sequences (converted from the nucleotide sequences of the clones) were compared to those of known hemopoietin receptors. According to the two-step Blast search above, human genome sequences encoding two clones of known hemopoietin receptor genes and one clone of novel hemopoietin receptor gene were identified. Subsequently,
25 specific oligonucleotide primers were designed based on the exon sequences predicted from the obtained nucleotide sequence. Clones corresponding to the N-terminal region and C-terminal region of NR12 were obtained by conducting 5'-RACE and 3'-RACE methods using the primers, and cDNA libraries of human fetal liver, adult thymus, and
30 adult testis as the templates. The complete nucleotide sequence of the full-length cDNA was revealed by determining the nucleotide sequences of both clones, and connecting the sequence at the duplicated center region.

From structural analyses, at least three kinds of transcription
35 products derived from splice variants were recognized. A cDNA clone of these splice variants comprising 337 amino acids and potentially

encoding a secretory form soluble receptor protein was named NR12.1; the other two clones, comprising 428 amino acids and 629 amino acids respectively and each encoding transmembrane form receptor proteins, were named NR12.2 and NR12.3. Because repeated structure of cysteine residues, YR motif, WS motif, and so on, that are conserved in the extracellular region of other family members were well conserved in the primary structure of all the isolated cDNA clones of NR12, it was considered that these clones encode typical hemopoietin receptors.

Subsequently, RT-PCR was performed using primer sets specific to NR12.1, NR12.2, and NR12.3, respectively, against mRNA derived from various human tissue. Then, tissues expressing these genes were searched, and the distribution and the expression pattern of the genes in each human tissue were analyzed. Finally, in order to discard the possibility of non-specific amplification and to quantify the amount of the RT-PCR products, the products of RT-PCR were subjected to Southern blotting using cDNA fragments specific to the respective clones. The result indicated that these clones are mainly expressed in hematopoietic cell line tissue and immune cell line tissue.

Furthermore, the present inventors succeeded in obtaining two clones (NR12.4 and NR12.5) encoding complete proteins that were 3 amino acids different from NR12.2 and NR12.3, respectively, by conducting PCR cloning against the cDNA library of human thymus (wherein five clones generically named "NR12" were isolated).

Based on the above features of NR12, NR12 is presumed to be a novel hemopoietin receptor molecule related to the regulation of the immune system or hematopoiesis. The gene encoding NR12 will be extremely useful in the screening for novel hematopoietic factors that can functionally bind to the receptor.

Moreover, the present inventors succeeded in isolating genomic fragments of mouse receptor homologues by conducting xenogenic cross hybridization cloning using cDNA of human NR12 as the probe. It is expected that further elucidation of the *in vivo* function of the receptor protein is possible by constructing mutant mouse lacking NR12 gene using the mouse gene fragments.

Consequently, the present invention relates to novel hemopoietin

receptors and genes encoding the receptors, as well as use of the same. More specifically, the present invention provides the following:

(1) a DNA selected from the group consisting of:

5 (a) a DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, and 10;

(b) a DNA comprising the coding region of the nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, and 9;

10 (c) a DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, and 10, in which one or more amino acids are modified by substitution, deletion, insertion, and/or addition, wherein said protein is functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, and 10; and,

15 (d) a DNA hybridizing under stringent conditions with a DNA consisting of the nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, and 9, and encoding a protein that is functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, and 10;

20 (2) a DNA encoding a partial peptide of a protein consisting of the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, and 10;

(3) a protein or peptide that is encoded by the DNA described in (1) or (2);

25 (4) a vector into which the DNA described in (1) or (2) is inserted;

(5) a transformant harboring the DNA described in (1) or (2), or the vector described in (4);

30 (6) a method for producing the protein or peptide of (3), comprising the steps of: culturing said transformant of (5), and recovering the expressed protein from said transformant or the culture supernatant;

(7) an antibody binding to the protein of (3);

35 (8) a polynucleotide complementary to either a DNA that comprises the nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, and 9 or its complementary strand, wherein the polynucleotide comprises at least 15 nucleotides; and,

(9) a method of screening for a compound that binds to the protein

of (3), comprising the steps of:

- (a) contacting a test sample with said protein or partial peptide thereof;
- 5 (b) detecting the binding activity of the test sample with the protein or partial peptide thereof; and,
- (c) selecting the compound that binds to the protein or partial peptide thereof.

The present invention provides a novel hemopoietin receptor "NR12". According to the results of the database searches on GenBank as well as 5'-RACE and 3'-RACE analysis, the present inventors finally succeeded in identifying and isolating a novel hemopoietin receptor gene NR12. It was found that at least three splice variants are transcribed from NR12. One of these variants, the cDNA clone NR12.1, encodes a soluble receptor-like protein. The other two predicted to encode transmembrane receptor proteins, cDNA clone NR12.2 and NR12.3, encode a protein presumed to have an intracellular region as short as 51 amino acids and as long as 252 amino acids, respectively.

Furthermore, the present inventors conducted PCR cloning against a cDNA library of human thymus to isolate the continuous full-length coding sequences (CDS). A clone having almost the same full-length ORF as NR12.2 was named NR12.4, and that having almost the same full-length ORF as NR12.3 was named NR12.5.

The nucleotide sequence of NR12.1 cDNA is shown in SEQ ID NO: 1, and the corresponding amino acid sequence of the protein encoded by the cDNA is shown in SEQ ID NO: 2. The nucleotide sequence of NR12.2 cDNA is shown in SEQ ID NO: 3, and the corresponding amino acid sequence of the protein encoded by the cDNA is shown in SEQ ID NO: 4. The nucleotide sequence of NR12.3 cDNA is shown in SEQ ID NO: 5, and the corresponding amino acid sequence of the protein encoded by the cDNA is shown in SEQ ID NO: 6. The nucleotide sequence of NR12.4 cDNA is shown in SEQ ID NO: 7, and the corresponding amino acid sequence of the protein encoded by the cDNA is shown in SEQ ID NO: 8. The nucleotide sequence of NR12.5 cDNA is shown in SEQ ID NO: 9, and the corresponding amino acid sequence of the protein encoded by the cDNA is shown in SEQ ID NO: 10.

Because the extracellular regions of NR12.1, NR12.2, NR12.3,

NR12.4, and NR12.5 are almost identical, these regions are thought to have the same tertiary structure and thereby recognize the same specific ligand.

Analyses of the gene expression in various human organs using
5 RT-PCR revealed: strong expression of NR12 in hematopoietic cell line tissues and immune cell line tissues such as adult spleen, thymus, lymph node, bone marrow, and peripheral leukocyte; and expression in testis, liver, lung, kidney, pancreas, and gastrointestinal tract, such as small intestine and colon. Additionally, expression of NR12
10 was also observed in all the analyzed mRNA derived from human fetal organs. From the revealed distribution pattern of NR12 gene expression, it was presumed that NR12 encodes a novel hematopoietic factor receptor, primarily because localization of strong expression in tissues thought to include immune cell lines and hematopoietic cells was detected.
15 Furthermore, the fact that NR12 expression was observed in tissues other than those described above suggests that NR12 can regulate not only physiological functions of the immune system and hematopoietic system *in vivo* but also various other physiological functions *in vivo*.

The above NR12 proteins are potentially useful for medical
20 application. Since NR12.1 is expressed in thymus, peripheral leukocytes, and spleen, it is predicted to be a receptor for an unknown hemopoietic factor. Therefore, NR12 proteins are useful tools in the identification of the unknown hemopoietic factor. They may also be used to screen a peptide library or synthetic chemical compounds to
25 isolate or identify agonists and antagonists that can functionally bind to the NR12 molecule. Moreover, clinical application is expected of novel molecules binding to the NR12 molecule and specific antibodies that can limit the function of the NR12 molecule to regulate the immune response or hematopoiesis *in vivo*, by searching such molecules and
30 antibodies.

NR12 is expected to be expressed in a restricted population of cells in the hemopoietic tissues, and thus, anti-NR12 antibodies are useful for the isolation of such cell populations. The isolated cell populations may be used in cell transplantation. Furthermore, it is
35 expected that the anti-NR12 antibody may be used for the diagnosis or treatment of diseases, such as leukemia.

On the other hand, the soluble proteins comprising the extracellular domain of NR12 protein and the splice variant of NR12, NR12.1, may be used as a decoy-type receptor to inhibit the NR12 ligand. They may be useful for the treatment of diseases in which NR12 is implicated, such as leukemia.

The present invention includes proteins that are functionally equivalent to the NR12 protein. For example, homologues of human NR12 protein are included. Herein, the term "functionally equivalent" refers to proteins having an equivalent biological activity as compared to that of an NR12 protein. Such biological activity may include the protein activity as a membrane bound or soluble form hematopoietic factor receptor.

Methods of introducing mutations for preparing proteins that are functionally equivalent to another protein are well known to a person skilled in the art. For example, one skilled in the art may use site-directed mutagenesis (Hashimoto-Gotoh T. et al. (1995), Gene 152, 271-275; Zoller, M. J. and Smith, M. (1983), Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W. and Fritz H. J. (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367; Kunkel, TA (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 82, 488-492; Kunkel (1988), Methods Enzymol. 85, 2763-2766) and such in order to introduce an appropriate mutation into the amino acid sequence of the human NR12 protein and prepare a protein that is functionally equivalent to the protein. Mutation of amino acids may occur in nature as well. The proteins of the present invention includes proteins having the amino acid sequence of human NR12 protein in which one or more amino acids are mutated, so long as the resulting proteins are functionally equivalent to human NR12 protein.

As a protein functionally equivalent to the NR12 protein of the invention, the following can be specifically mentioned: one in which one or two, preferably, two to 30, more preferably, two to 10 amino acids are deleted in any one of the amino acid sequences of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, or 10; one in which one or two, preferably, two to 30, more preferably, two to 10 amino acids have been added into any one of the amino acid sequences of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, or 10; one in which one or two, preferably, two to 30, more preferably, two

to 10 amino acids have been substituted with other amino acids in any one of the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, or 10.

As for the amino acid residue to be mutated, it is preferable
5 that it be mutated into a different amino acid that allows the properties
of the amino acid side-chain to be conserved. Examples of properties
of amino acid side chains are the following: hydrophobic amino acids
(A, I, L, M, F, P, W, Y, V), hydrophilic amino acids (R, D, N, C,
E, Q, G, H, K, S, T), and amino acids comprising the following side
10 chains: an aliphatic side-chain (G, A, V, L, I, P); a hydroxyl group
containing side-chain (S, T, Y); a sulfur atom containing side-chain
(C, M); a carboxylic acid and amide containing side-chain (D, N, E,
Q); a base containing side-chain (R, K, H); and an aromatic containing
side-chain (H, F, Y, W) (The parenthetic letters indicate the one-letter
15 codes of amino acids).

It is known that a protein may have an amino acid sequence modified
by deletion, addition, and/or substitution of other amino acids for
one or more amino acid residues, yet still retain its biological activity
(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1984), 81, 5662-5666;
20 Zoller, M. J. & Smith, M., Nucleic Acids Research, (1982), 10, 6487-6500;
Wang, A. et al., Science, 224, 1431-1433;, Dalbadie-McFarland, G.
et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1982), 79, 6409-6413).

A fusion protein comprising human NR12 protein is an example
of a protein in which one or more amino acids residues have been added
25 to the amino acid sequence of a human NR12 protein (e.g., SEQ ID NO:
2, 4 6, 8 or 10). A fusion protein is made by fusing the human NR12
protein with another peptide(s) or protein(s) and is included in the
present invention. A fusion protein can be prepared by ligating a
DNA encoding the human NR12 protein of the present invention with
30 a DNA encoding another peptide(s) or protein(s) in frame, introducing
the ligated DNA into an expression vector, and expressing the fusion
gene in a host. Methods known by one skilled in the art can be used
for preparing such a fusion gene. There is no restriction as to the
other peptide(s) or protein(s) that is (are) fused to the protein
35 of the present invention.

Other peptide(s) to be fused with a protein of the present invention

include known peptides, for example, FLAG (Hopp, T.P. et al., Biotechnology (1988) 6, 1204-1210), 6x His consisting of six His (histidine) residues, 10x His, Influenza agglutinin (HA), human c-myc fragment, VSV-GP fragment, p18HIV fragment, T7-tag, HSV-tag, E-tag, 5 SV40T antigen fragment, lck tag, α -tubulin fragment, B-tag, Protein C fragment, and so on. Other examples of proteins to be fused with the protein of the present invention are the GST (glutathione-S-transferase), Influenza agglutinin (HA), immunoglobulin constant region, β -galactosidase, MBP 10 (maltose-binding protein), and such.

Fusion proteins can be prepared by fusing commercially available DNA encoding these peptides or proteins with DNA encoding a protein of the present invention and expressing the fused DNA prepared.

The hybridization technique (Sambrook, J. et al., Molecular 15 Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press; 1989) is well known to those skilled in the art as an alternative method for preparing a protein functionally equivalent to a certain protein. More specifically, one skilled in the art can utilize the general procedure to obtain a protein functionally equivalent to a human NR12 20 protein by isolating DNA having a high homology with the whole or part of a DNA sequence encoding the human NR12 protein (e.g., SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 or 9). Thus, the proteins of the present invention include such proteins, that are encoded by DNAs that hybridizes with a DNA encoding a human NR12 protein or part thereof and that are 25 functionally equivalent to a human NR12 protein. Examples include homologues of human NR12 in other mammals (for example, those of monkey, rat, mouse, rabbit, and bovine gene). In order to isolate a cDNA with high homology to a DNA encoding a human NR12 protein from animals, it is preferable to use a hematopoietic cell line tissue such as spleen, 30 thymus, lymph node, bone marrow, and peripheral leukocyte; however, the invention is not limited thereto.

Stringent hybridization conditions for isolating DNA encoding proteins functionally equivalent to a human NR12 protein can be suitably selected by one skilled in the art, and for example, low-stringent 35 conditions can be given. Low-stringent conditions are, for example, 42 °C, 2x SSC, and 0.1% SDS, and preferably, 50 °C, 2x SSC, and 0.1%

SDS. High stringent conditions are more preferable and include, for example, 65 °C, 2x SSC, and 0.1% SDS. Under these conditions, at lower temperatures, the DNA obtained will have a lower homology. Conversely, it is expected that the homology of the obtained DNA will be higher 5 at higher temperatures. However, several factors other than temperature, such as salt concentration, can also influence the stringency of hybridization and one skilled in the art can routinely select the factors to accomplish a similar stringency.

In place of hybridization, the gene amplification method, for 10 example, the polymerase chain reaction (PCR) method can be utilized to isolate the object DNA, using primers synthesized based on the sequence information of a DNA (e.g., SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 or 9) encoding human NR12 protein.

Proteins that are functionally equivalent to human NR12 protein, 15 encoded by DNA isolated through the above hybridization technique or by the gene amplification techniques, usually have a high homology to the amino acid sequence of the human NR12 protein. The proteins of the present invention also include proteins that are functionally equivalent to the human NR12 protein, which also have a high homology 20 with the protein comprising any one of the amino acid sequences of SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, and 10. High homology is normally defined as a homology of 70% or higher, preferably 80% or higher, more preferably 90% or higher, and most preferably 95% or higher. The homology of a protein can be determined by the algorithm in "Wilbur, W. J. and 25 Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730".

The amino acid sequence, molecular weight, isoelectric point, the presence or absence of sugar chains, and the form of a protein of the present invention may differ according to the producing cells, host, or purification method described below. However, so long as 30 the obtained protein has an equivalent function to human NR12 protein (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 or 10), it is included in the present invention. For example, if a protein of the present invention is expressed in prokaryotic cells, such as *E. coli*, a methionine residue is added at the N-terminus of the amino acid sequence of the expressed protein. 35 If a protein of the present invention is expressed in eukaryotic cells, such as mammalian cells, the N-terminal signal sequence is removed.

Such proteins are also included as proteins of the present invention.

For example, as a result of analysis of the protein of the invention based on the method in "Von Heijne, G., Nucleic Acids Research, (1986), 14, 4683-4690", it was presumed that the signal sequence extends from 5 the 1st Met to the 23rd Gly in the amino acid sequences of SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 and 10. Therefore, the present invention encompasses a protein comprising the sequence from the 24th Gly to 337th Cys in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Similarly, the present invention encompasses a protein comprising the sequence from the 24th Gly to 428th Ser in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4. Similarly, the 10 present invention encompasses a protein comprising the sequence from the 24th Gly to 629th Lys in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6. Similarly, the present invention encompasses a protein comprising the sequence from the 24th Gly to 428th Ser in the amino acid sequence 15 of SEQ ID NO: 8. Similarly, the present invention encompasses a protein comprising the sequence from the 24th Gly to 629th Lys in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10.

A protein of the present invention can be prepared by methods known to one skilled in the art, as a recombinant protein, and also 20 as a natural protein. A recombinant DNA can be prepared by inserting a DNA encoding the protein of the present invention (for example, the DNA comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 or 9) into a suitable expression vector, introducing the vector 25 into a suitable host cell, and collecting the extract from the resulting transformant. After obtaining the extract, recombinant protein can be purified and prepared by subjecting to chromatography, such as ion exchange chromatography, reverse phase chromatography, gel filtration, and such, or affinity chromatography, wherein antibodies against the protein of the present invention are immobilized, or using 30 one or more of these columns in combination.

Further, when a protein of the present invention is expressed within host cells (for example, animal cells and *E. coli*), as a fusion protein with glutathione-S-transferase protein or as a recombinant protein supplemented with multiple histidines, the expressed 35 recombinant protein can be purified using a glutathione column or nickel column.

After purifying the fusion protein, it is also possible to exclude regions other than the objective protein by cutting with thrombin, factor-Xa, and such, as required.

A natural protein may be isolated by methods known to one skilled 5 in the art. For example, extracts of tissue or cells expressing a protein of the invention may be reacted with an affinity column described below, to which antibodies binding to the human NR12 protein are attached, to isolate the natural protein. Polyclonal or monoclonal antibodies may be used.

10 The present invention also includes partial peptides of the proteins of the present invention. A partial peptide consists of an amino acid sequence specific to a protein of the present invention and is composed of at least 7 amino acids, preferably more than 8 amino acids, and more preferably more than 9 amino acids. The partial 15 peptides may be useful, for example, for preparing antibodies against a protein of the present invention; for screening compounds binding to a protein of the present invention, or for screening accelerators or inhibitors of a protein of the present invention. Alternatively, they may be used as antagonists for the ligand of a protein of the 20 present invention. A partial peptide of a protein of the present invention is, for example, a partial peptide having the active center of the protein consisting of the amino acid sequences of SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, or 10. Additionally, the partial peptides may comprise one or more regions of the hydrophilic region and hydrophobic region 25 determined by hydrophobicity plot analysis. These partial peptides may contain the whole hydrophilic region or a part of a hydrophilic region, or may contain the whole or a part of the hydrophobic region. Moreover, for example, soluble proteins and proteins comprising extracellular regions of a protein of the invention are also encompassed 30 in the invention.

The partial peptides of the invention may be produced by genetic engineering techniques, well-known peptide synthesizing methods, or by excising a protein of the invention with a suitable peptidase. For example, the solid phase synthesizing method or liquid phase 35 synthesizing method may be used as peptide synthesizing method.

Another object of the present invention is to provide a DNA encoding

a protein of the present invention. The DNA may be useful for producing the above proteins of the present invention *in vivo* or *in vitro*. Furthermore, for example, it is also possible to use the DNA for application to gene therapy and such of diseases arising from 5 abnormalities of the gene encoding the protein of the present invention. The DNA may be provided in any form, so long as it encodes a protein of the present invention. Thus, the DNA may be a cDNA synthesized from mRNA, genomic DNA, or chemically synthesized DNA. Furthermore, a DNA comprising any nucleotide sequence based on the degeneracy of 10 genetic code may be included so long as it encodes a protein of the present invention.

The DNA of the present invention can be prepared by any method known to a person skilled in the art. For example, the DNA of the present invention may be prepared by constructing a cDNA library from 15 cells expressing the protein of the present invention, and conducting hybridization using as a probe a partial sequence of a DNA of the present invention (for example, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 or 9). A cDNA library may be constructed, for example, according to the method described in the literature (Sambrook J. et al., Molecular Cloning, 20 Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), or a commercial cDNA library may be used. Alternatively, the DNA may be prepared by obtaining RNA from a cell expressing a protein of the present invention, synthesizing oligo DNA based on the sequence of a DNA of the present invention (for example, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 or 9), conducting PCR 25 using the synthesized DNA as primers, and amplifying the cDNA encoding a protein of the present invention.

By determining the nucleotide sequence of the obtained cDNA, the translation region encoded by the cDNA can be determined, and the amino acid sequence of the protein of the present invention can 30 be obtained. Furthermore, genomic DNA can be isolated by screening genomic DNA libraries using the obtained cDNA as a probe.

Specifically, this can be done as follows: first, mRNA is isolated 35 from cells, tissues, or organs expressing a protein of the invention (for example, hematopoietic-competent cell line tissue such as spleen, thymus, lymph node, bone marrow, peripheral leukocyte and immunocompetent cell line tissue, and such). To isolate the mRNA,

at first, whole RNA is prepared using well-known methods, for example, the guanidine ultracentrifugation method (Chirgwin J.M. et al. Biochemistry 18:5294-5299 (1979)), the AGPC method (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. 162:156-159 (1987)), and such. Next, 5 mRNA from whole mRNA can be purified using the mRNA Purification Kit (Pharmacia), and such. Alternatively, mRNA may be directly prepared by QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia).

cDNA can then be synthesized using reverse transcriptase from the obtained mRNA. cDNA can be synthesized by using the AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (Seikagaku Kogyo), etc. Additionally, cDNA synthesis and amplification may be also performed using the primer and such described herein, following the 5'-RACE method (Frohman, M.A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8998-9002 (1988); Belyavsky, A. et al. Nucleic Acids Res. 17:2919-2932 (1989)) 10 utilizing the polymerase chain reaction (PCR) and the 5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech). 15

The objective DNA fragment is prepared from the obtained PCR product and ligated with a vector DNA. Thus, a recombinant vector is created and introduced into *E. coli*, and such, and colonies are 20 selected to prepare the desired recombinant vector. The nucleotide sequence of the objective DNA can be verified by conventional methods, for example, dideoxynucleotide chain termination.

With regards to the DNA of the invention, a sequence with higher expression efficiency can be designed by considering the codon usage 25 frequency in the host used for the expression (Grantham R. et al. Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-74). The DNA of the present invention may also be modified using commercially available kits and conventional methods. Illustrative modifications include, for instance, digestion by restriction enzymes, insertion of synthetic 30 oligonucleotides and suitable DNA fragments, addition of linkers, insertion of a initiation codon (ATG) and/or stop codon (TAA, TGA, or TAG), and such.

Specifically, the DNA of the present invention includes DNA comprising the nucleotide sequence from the 98th "A" to the 1108th 35 "C" of SEQ ID NO: 1; the 98th "A" to 1381st "C" of SEQ ID NO: 3; the 98th "A" to 1984th "G" of SEQ ID NO: 5; the 1st "A" to 1284th "C" of

SEQ ID NO: 7; and the 1st "A" to 1887th "G" of SEQ ID NO: 9.

Furthermore, the present invention includes DNA that hybridize under stringent conditions to the DNA consisting of any one of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 or 9, so long as the 5 resulting DNA encodes a protein functionally equivalent to the above-mentioned protein of the invention.

One skilled in the art can suitably select stringent conditions, and for example, low-stringent conditions can be given. Low-stringent conditions are, for example, 42°C, 2x SSC, and 0.1% SDS, and preferably 10 50°C, 2x SSC, and 0.1% SDS. More preferable are highly stringent conditions which are, for example, 65°C, 2x SSC, and 0.1% SDS. Under these conditions, the higher the temperature, the higher the homology of the obtained DNA will be. The above hybridizing DNA is preferably a natural DNA, such as cDNA and chromosomal DNA.

15 Moreover, the present invention provides a vector containing a DNA of the present invention as an insert. The vector of the present invention may be useful for maintaining the DNA of the present invention in host cells or producing the protein of the present invention.

If the host cell is *E. coli* (such as JM109, DH5α, HB101, and 20 XL1Blue), any vector may be used as long as it contains the "ori" for amplification in *E. coli* that enables large-scale preparation, and a selection marker for transformants (for example, a drug-resistance gene that enables selection by a drug such as ampicillin, tetracycline, kanamycin, and chloramphenicol). For example, 25 M13-series vectors, pUC-series vectors, pBR322, pBluescript, PCR-Script, and so on can be used. For the purpose of subcloning or excision of a cDNA, pGEM-T, pDIRECT, pT7, and such may be used as well. For producing the protein of the present invention, an expression vector is especially useful. For example, if the protein is to be 30 expressed in *E. coli*, the expression vector must have characteristics such as those mentioned above to be amplified in *E. coli*. Additionally, when *E. coli*, such as JM109, DH5α, HB101, or XL1 Blue, is used as the host cell, the vector must have a promoter, for example, the lacZ promoter (Ward et al., Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 35 6, 2422-2427), the araB promoter (Better et al., Science (1988) 240, 1041-1043), the T7 promoter, and such, that can efficiently express

the desired gene in *E. coli*. Such vectors include pGFX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen), pEGFP, pET (in this case, a host is preferably BL21 which expresses T7 RNA polymerase), and so on, except those mentioned above.

5 Vectors may be introduced into host cells, for example, by the calcium chloride method or electroporation. The vector may also contain a signal sequence for polypeptide secretion. The *pelB* signal sequence (Lei, S. P. et al. J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) may be used to produce the proteins in the periplasm in *E. coli*.

10 For example, an expression vector for the preparation of a protein of the present invention may be a mammal-derived expression vector (for example, pcDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18 (17), p5322), pEF, and pCDM8); an insect cell-derived expression vector (for example, "Bac-to-BAC baculovirus expression system" (GIBCO BRL), pBacPAK8); a plant-derived expression vector (for example, pMH1 and pMH2); an animal virus-derived expression vector (for example, pHSV, pMV, and pAdexLcw); a retrovirus-derived expression vector (for example, pZIpneo); an yeast-derived expression vector (for example, "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, and SP-Q01); or a *Bacillus subtilis*-derived expression vectors (for example, pPL608 and pKTH50), other than *E. coli*.

15 For the expression in animal cells, such as CHO, COS, and NIH3T3 cells, the expression vector must have a promoter such as the SV40 promoter (Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108), MMLV-LTR promoter, the EF1 α promoter (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), and the CMV promoter. More preferably, the vector may contain a marker gene for the selection of transformants (for example, a drug resistance gene for selection by a drug such as neomycin and G418). Such vectors include pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOp13, and so on.

20 Furthermore, in order to achieve stable gene expression and amplification of the copy number of genes in cell, CHO cells deficient in the metabolic pathway for nucleotide synthesis may be used. The CHO cell is transfected with an expression vector comprising the DHFR gene that complements the deficiency (for example, pCHO I), then the vector may be amplified by methotrexate (MTX) treatment. For transient

gene expression, COS cells containing a gene expressing the SV40 T-antigen on its chromosome may be used to transform with a vector containing the SV40 replication origin (e.g. pcD). Examples of replication origins to be used in the present invention include those 5 derived from polyomavirus, adenovirus, bovine papillomavirus (BPV), and such. Moreover, to amplify the gene copies in host cell lines, the expression vector may include an aminoglycoside transferase (APH) gene, thymidine kinase (TK) gene, *E.coli* xanthine guanine phosphoribosyl transferase (Ecogpt) gene, dihydrofolate reductase 10 (dhfr) gene, and such as a selective marker.

On the other hand, *in vivo* expression of a DNA of the present invention in animals may be performed by, for example, by inserting a DNA of the present invention into an appropriate vector and introducing the vector into the body using retrovirus, liposome, cationic liposome, 15 adenovirus, and so on. It is possible to use these methods to perform gene therapy for diseases that arise from mutations in the NR12 gene of the present invention. Examples of vectors used for this purpose include, for example, adenovirus vectors (for example pAdexlcw), retrovirus vectors (for example, pZIPneo), and such, but are not limited 20 thereto. General gene manipulations, for example, insertion of the DNA of the present invention into a vector, may be performed by using standard methods (Molecular Cloning, 5.61-5.63). The vector may be administered to a living body through *ex vivo* or *in vivo* methods.

Another object of the present invention is to provide a 25 transformant that contains a DNA or vector of the present invention. The host cell to insert a vector of the invention is not limited in any way, and for example, *E. coli*, a variety of animal cells, and so on may be used. The host cells of the present invention may be, for example, used as a production system for preparing or expressing 30 a protein of the present invention. *In vitro* and *in vivo* production systems are known as production system for producing proteins. Production systems using eukaryotic cells and prokaryotic cells may be used as the *in vitro* production systems.

When using eukaryotic cells, production system using, for example, 35 animal cells, plant cells, and fungal cells are available as hosts. Exemplary animal cells to be used include mammalian cells such as

CHO (J. Exp. Med. 108:945 (1995)), COS, 3T3, myeloma, baby hamster kidney (BHK), HeLa, Vero cells; amphibian cells such as Xenopus oocytes (Valle, et al. Nature 291:338-340 (1981)); and insect cells such as Sf9, Sf21, or Tn5. As CHO cells, especially DHFR gene-deficient CHO 5 cell, dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:4216-4220 (1980)), and CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 60:1275 (1968)) can be suitably used. For large-scale preparation in animal cells, CHO cells may be preferably used. The vector may be introduced into host cells, for example, by the calcium phosphate method, the DEAE dextran method, 10 methods using cationic liposome DOTAP (Boehringer Mannheim), the electroporation method, the lipofection method, and so on.

Nicotiana tabacum-derived cells are well known as protein production systems in plant cells, and these can be callus cultured. As fungal cells, yeasts such as the *Saccharomyces* genus, for example, 15 *Saccharomyces cerevisiae*; filamentous fungi, such as *Aspergillus* genus, for example, *Aspergillus niger* are known.

Bacterial cells may be used as prokaryotic production system. As bacterial cells, *E. coli*, for example, JM109, DH5 α , HB101, and such, as well as others like *Bacillus subtilis* are known.

Proteins can be obtained by transforming these cells with the objective DNA, and culturing the transformed cells *in vitro*. Transformants can be cultured according to known methods. For example, 20 DMEM, MEM, RPMI1640, and IMDM can be used as culture media of animal cells. Occasionally, fetal calf serum (FCS) and such serum supplements may be added in the above media; alternatively, a serum-free culture 25 medium may be used. The pH of the culture medium is preferably from about pH 6 to 8. The culturing is usually performed at about 30 to 40°C, for about 15 to 200 hr, and the culture medium changes, aeration, and stirring are done as necessary.

On the other hand, for example, production systems using animals 30 and plants may be given as *in vivo* protein production systems. The objective DNA is introduced into the animal or plant, and the protein is produced within the plant or animal, and then, the protein is recovered. The term "host" as used in the present invention encompasses 35 such animals and plants as well.

When using animals, mammalian and insect production systems can

be used. As mammals, goats, pigs, sheep, mice, and bovines may be used (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Alternatively, transgenic animals may also be used when using mammals.

For instance, the objective DNA may be prepared as a fusion gene 5 with a gene encoding a protein intrinsically produced into milk, such as goat β casein. Next, the DNA fragment comprising the fusion gene is injected into goat's embryo, and this embryo is implanted in female goat. The objective protein can be recovered from the milk of the transgenic goats produced from the goat that received the embryo and 10 offspring thereof. To increase the amount of protein-containing milk produced from the transgenic goat, a suitable hormone(s) may be administered to the transgenic goats (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology 12:699-702 (1994)).

Silk worms may be used as insects. When using silk worms, they 15 are infected with baculoviruses to which the DNA encoding objective protein has been inserted, and the desired protein can be recovered from body fluids of the silk worm (Susumu M. et al. Nature 315:592-594 (1985)).

When using plants, for example, tobacco can be used. In the case 20 of tobacco, the DNA encoding the objective protein is inserted into a plant expression vector, for example, pMON530, and this is inserted into a bacteria, such as *Agrobacterium tumefaciens*. This bacterium is infected to tobacco, for example, *Nicotiana tabacum*, and it is able to obtain the desired polypeptide from the tobacco leaves (Julian 25 K. -C. Ma et al. Eur. J. Immunol. 24:131-138 (1994)).

Thus-obtained proteins of the present invention are isolated from inside or outside (e.g. medium) of the host cell, and may be purified as a substantially pure homogeneous protein. The separation and purification of the protein can be done using conventional 30 separation and purification methods used to purify proteins and are not limited to any specific method. For instance, column chromatography, filter, ultrafiltration, salt precipitation, solvent precipitation, solvent extraction, distillation, immunoprecipitation, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, 35 isoelectric point electrophoresis, dialysis, recrystallization, and such may be suitably selected, or combined to separate and purify

the protein.

For example, affinity chromatography, ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration, reverse phase chromatography, adsorption chromatography, and such can be exemplified as chromatographies (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). These chromatographies can be performed by liquid chromatography, such as HPLC, FPLC, and such. The present invention encompasses proteins highly purified by using such purification methods.

Proteins can be arbitrarily modified, or peptides can be partially excised by treating the proteins with appropriate protein modification enzymes prior to or after the purification. Trypsin, chymotrypsin, lysyl-endopeptidase, protein kinase, glucosidase, and such are used as protein modification enzymes.

The present invention also provides antibodies that bind to the protein of the invention. There is no particular restriction as to the form of the antibody of the invention and the present invention includes polyclonal antibodies, as well as monoclonal antibodies. The antiserum obtained by immunizing animals such as rabbits with a protein of the invention, as well as polyclonal and monoclonal antibodies of all classes, human antibodies, and humanized antibodies produced by genetic recombination, are also included.

A protein of the invention that is used as a sensitizing antigen for obtaining antibodies is not restricted by the animal species from which it is derived, but is preferably a protein derived from mammals, for example, humans, mice, or rats, especially preferably from humans. Protein of human origin can be obtained by using the nucleotide sequence or amino acid sequences disclosed herein.

Herein, an intact protein or its partial peptide may be used as the antigen for immunization. As partial peptides of the proteins, for example, the amino (N)-terminal fragment of the protein, and the carboxy (C)-terminal fragment can be given. "Antibody" as used herein means an antibody that specifically reacts with the full-length or fragments of the protein.

A gene encoding a protein of the invention or a fragment thereof

is inserted into a known expression vector, and, by transforming the host cells with the vector described herein, the desired protein or a fragment thereof is recovered from outside or inside the host cells using standard methods. This protein can be used as the sensitizing 5 antigen. Also, cells expressing the protein, cell lysates, or a chemically synthesized protein of the invention may be also used as a sensitizing antigen.

The mammal that is immunized by the sensitizing antigen is not restricted; however, it is preferable to select animals by considering 10 the compatibility with the parent cells used in cell fusion. Generally, animals belonging to the rodentia, lagomorpha, and Primates are used.

Examples of animals belonging to rodentia that may be used include, for example, mice, rats, hamsters, and such. Examples of animals belonging to lagomorpha that may be used include, for example, rabbits. 15 Examples of animals of Primates that may be used include, for example, monkeys. Examples of monkeys to be used include the infraorder catarrhini (old world monkeys), for example, *Macaca fascicularis*, rhesus monkeys, sacred baboons, chimpanzees, and such.

Well-known methods may be used to immunize animals with the 20 sensitizing antigen. For example, the sensitizing antigen is injected intraperitoneally or subcutaneously into mammals. Specifically, the sensitizing antigen is suitably diluted and suspended in physiological saline, phosphate-buffered saline (PBS), and so on, and mixed with a suitable amount of general adjuvant if desired, for example, with 25 Freund's complete adjuvant. Then, the solution is emulsified and injected into the mammal. Thereafter, the sensitizing antigen suitably mixed with Freund's incomplete adjuvant is preferably given several times every 4 to 21 days. A suitable carrier can also be used when immunizing an animal with the sensitizing antigen. After the 30 immunization, the elevation in the level of serum antibody is detected by usual methods..

Polyclonal antibodies against the proteins of the present invention can be prepared as follows. After verifying that the desired 35 serum antibody level has been reached, blood is withdrawn from the mammal sensitized with antigen. Serum is isolated from this blood using conventional methods. The serum containing the polyclonal

antibody may be used as the polyclonal antibody, or according to needs, the polyclonal antibody-containing fraction may be further isolated from the serum. For instance, a fraction of antibodies that specifically recognize the protein of the invention may be prepared 5 by using an affinity column to which the protein is coupled. Then, the fraction may be further purified by using a Protein A or Protein G column in order to prepare immunoglobulin G or M.

To obtain monoclonal antibodies, after verifying that the desired serum antibody level has been reached in the mammal sensitized with 10 the above-described antigen, immunocytes are taken from the mammal and used for cell fusion. For this purpose, splenocytes can be mentioned as preferable immunocytes. As parent cells fused with the above immunocytes, mammalian myeloma cells are preferably used. More 15 preferably, myeloma cells that have acquired the feature, which can be used to distinguish fusion cells by agents, are used as the parent cell.

The cell fusion between the above immunocytes and myeloma cells can be conducted according to known methods, for example, the method by Milstein et al. (Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. 20 (1981) 73, 3-46).

The hybridoma obtained from cell fusion is selected by culturing the cells in a standard selection medium, for example, HAT culture medium (medium containing hypoxanthine, aminopterin, and thymidine). The culture in this HAT medium is continued for a period sufficient 25 enough for cells (non-fusion cells) other than the objective hybridoma to perish, usually from a few days to a few weeks. Then, the usual limiting dilution method is carried out, and the hybridoma producing the objective antibody is screened and cloned.

Other than the above method for obtaining hybridomas, by 30 immunizing an animal other than humans with the antigen, a hybridoma producing the objective human antibodies having the activity to bind to proteins can be obtained by the method of sensitizing human lymphocytes, for example, human lymphocytes infected with the EB virus, with proteins, protein-expressing cells, or lysates thereof *in vitro* 35 and fusing the sensitized lymphocytes with myeloma cells derived from human, for example, U266, having a permanent cell division ability

(Unexamined Published Japanese Patent Application (JP-A) No. Sho 63-17688).

The monoclonal antibodies obtained by transplanting the obtained hybridomas into the abdominal cavity of a mouse and extracting ascites
5 can be purified by, for example, ammonium sulfate precipitation, protein A or protein G column, DEAE ion exchange chromatography, an affinity column to which the protein of the present invention is coupled, and so on. An antibody of the present invention may be used for the purification or detection of a protein of the present invention. It
10 may also be a candidate as an agonist or antagonist of a protein of the present invention. Furthermore, it is possible to use it in antibody treatment for diseases in which the protein is implicated. For the administration to human body (antibody treatment), human antibodies or humanized antibodies are preferably used because of
15 their reduced immunogenicity.

For example, a human antibody against a protein can be obtained using hybridomas made by fusing myeloma cells with antibody-producing cells obtained by immunizing a transgenic animal comprising a repertoire of human antibody genes with an antigen such as protein,
20 protein-expressing cells, or lysates thereof (see WO92-03918, WO93-2227, WO94-02602, WO94-25585, WO96-33735, and WO96-34096).

Other than producing antibodies using hybridoma, antibody producing immunocytes, such as sensitized lymphocytes that are immortalized by oncogenes, may also be used.

25 Such monoclonal antibodies can be also obtained as recombinant antibodies produced by using the genetic engineering technique (see, for example, Borrebaeck C.A.K. and Larrick, J.W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD (1990)). Recombinant antibodies are produced by
30 cloning the encoding DNA from immunocytes, such as hybridoma or antibody-producing sensitized lymphocytes, incorporating into a suitable vector, and introducing this vector into a host to produce the antibody. The present invention encompasses such recombinant antibodies as well.

35 Moreover, the antibody of the present invention may be an antibody fragment or modified-antibody, so long as it binds to a protein of

the invention. For instance, Fab, F (ab')₂, Fv, or single chain Fv (scFv) in which the H chain Fv and the L chain Fv are suitably linked by a linker (Huston J.S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883 (1988)) can be given as antibody fragments. Specifically,
5 antibody fragments are generated by treating antibodies with enzymes, for example, papain or pepsin. Alternatively, they may be generated by constructing a gene encoding an antibody fragment, introducing this into an expression vector, and expressing this vector in suitable host cells (see, for example, Co M.S. et al. J. Immunol. (1994) 152, 10 2968-2976; Better M. and Horwitz A.H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R.E. and Walker, B.W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

15 As modified antibodies, antibodies bound to various molecules, such as polyethylene glycol (PEG), can be used. The antibodies of the present invention encompass such modified antibodies as well. To obtain such a modified antibody, chemical modifications are done to the obtained antibody. These methods are already established and 20 conventional in the field.

An antibody of the present invention may be obtained as a chimeric antibody, comprising non-human antibody-derived variable region and human antibody-derived constant region, or as a humanized antibody comprising non-human antibody-derived complementarily determining 25 region (CDR), human antibody-derived framework region (FR), and human antibody-derived constant region by using conventional methods.

Antibodies thus obtained can be purified to uniformity. The separation and purification methods used in the present invention for separating and purifying the antibody may be any method usually 30 used for proteins. For example, column chromatography, such as affinity chromatography, filter, ultrafiltration, salting-out, dialysis, SDS polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing, and others, may be appropriately selected and combined to isolate and purify the antibodies (Antibodies: A Laboratory Manual. 35 Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988); however, the invention is not limited thereto. Antibody concentration of the

above mentioned antibody can be assayed by measuring the absorbance, or by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), etc.

Protein A or Protein G column can be used for the affinity chromatography. Protein A column may be, for example, Hyper D, POROS, 5 Sepharose F. F. (Pharmacia), etc.

Other chromatography may also be used, for example, such as ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration, reverse-phase chromatography, and adsorption chromatography (Strategies for Protein Purification and 10 Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). These may be performed on liquid-phase chromatography such as HPLC, FPLC, and so on.

Examples of methods that assay the antigen-binding activity of 15 the antibodies of the invention include, for example, measurement of absorbance, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), enzyme immunoassay (EIA), radioimmunoassay (RIA), and/or immunofluorescence. For example, when using ELISA, a protein of the invention is added to a plate coated with the antibodies of the present invention, and 20 then, the objective antibody sample, for example, culture supernatants of antibody-producing cells, or purified antibodies are added. Then, secondary antibody recognizing the primary antibody, which is labeled by alkaline phosphatase and such enzymes, is added, the plate is incubated and washed, and the absorbance is measured to evaluate the 25 antigen-binding activity after adding an enzyme substrate such as p-nitrophenyl phosphate. As the protein, a protein fragment, for example, a fragment comprising a C-terminus, or a fragment comprising an N-terminus may be used. To evaluate the activity of the antibody of the invention, BIACore (Pharmacia) may be used.

30 By using these methods, the antibody of the invention and a sample presumed to contain a protein of the invention are contacted, and the protein of the invention is detected or assayed by detecting or assaying the immune complex formed between the above-mentioned antibody and the protein.

35 A method of detecting or assaying a protein of the invention is useful in various experiments using proteins as it can specifically

detect or assay the proteins.

Another object of this invention is to provide a polynucleotide of at least 15 nucleotides that is complementary to the DNA encoding human NR12 protein (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 or 9) or its complementary strand.

Herein, the term "complementary strand" is defined as one strand of a double strand polynucleotide composed of A:T and G:C base pairs to the other strand. Also, "complementary" is defined as not only those completely matching within a continuous region of at least 15 nucleotides, but also having a homology of at least 70%, preferably 80%, more preferably 90%, and most preferably 95% or higher within that region. The homology may be determined using the algorithm described herein.

Probes and primers for detection or amplification of the DNA encoding a protein of the invention, or a nucleotide or nucleotide derivative for the suppression of the protein expression (such as, antisense oligonucleotide and ribozyme) are included in these polynucleotides. Such polynucleotides may be also used for preparing DNA chips.

The antisense oligonucleotides that hybridize with a portion of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, and 9 are also included in the antisense oligonucleotides of the present invention. These antisense oligonucleotides are preferably directed against a sequence which contains at least 15 continuous nucleotides comprised in any one of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, and 9. More preferably, it is the antisense oligonucleotide against at least 15 continuous nucleotides containing a translation start codon.

Derivatives or modified products of antisense oligonucleotides can be used as antisense oligonucleotides. Examples of such modified products include, for example, lower alkyl phosphonate modifications such as methyl-phosphonate-type or ethyl-phosphonate-type; phosphorothioate modifications; phosphoroamidate modifications, and such.

The term "antisense oligonucleotides" as used herein means, not only those in which the nucleotides corresponding to those constituting

a specified region of a DNA or mRNA are entirely complementary, but also those having a mismatch of one or more nucleotides, so long as the DNA or mRNA and the oligonucleotide can specifically hybridize with the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 or 9.

5 The antisense oligonucleotide derivatives of the present invention act upon cells producing a protein of the invention by binding to the DNA or RNA encoding the protein to inhibit its transcription or translation, and to promote the degradation of the mRNA, and have an effect of suppressing the function of the protein of the invention 10 by suppressing the expression of the protein.

An antisense oligonucleotide derivative of the present invention can be made into an external preparation, such as a liniment or a poultice, by mixing with a suitable base material, which is inactive against the derivatives.

15 Also, as needed, the derivatives can be formulated into tablets, powders, granules, capsules, liposome capsules, injections, solutions, nose-drops, freeze-dried agents, and such by adding excipients, isotonic agents, solubilizing agents, stabilizers, preservative substance, pain-killers, and such. These can be prepared using 20 conventional methods.

An antisense oligonucleotide derivative is given to the patient by directly applying it onto the ailing site, by injecting it into the blood vessel and such, so that it will reach the ailing site. An antisense-mounting medium can also be used to increase durability 25 and membrane-permeability. Examples are, liposome, poly-L-lysine, lipid, cholesterol, lipofectin or derivatives of them.

The dosage of the antisense oligonucleotide derivative of the present invention can be adjusted suitably according to the patient's condition and used in desired amounts. For example, a dose range of 30 0.1 to 100 mg/kg, preferably 0.1 to 50 mg/kg can be administered.

The antisense oligonucleotide of the present invention is useful in inhibiting the expression of the protein of the invention, and therefore is useful in suppressing the biological activity of the proteins of the invention. Also, expression-inhibitors comprising 35 the antisense oligonucleotide of the invention are useful, because of their capability to suppress the biological activity of the proteins

of the invention.

Proteins of this invention are useful in screening for compounds that bind to the protein. That is, the proteins are used in a method of screening for compounds that bind to the proteins of this invention, 5 in which the method comprises bringing proteins of this invention into contact with a test sample that is expected to contain a compound that may bind to the proteins and selecting the compound with the activity of binding to the proteins of the invention..

Proteins of this invention to be used in the screening of the 10 invention may be any of recombinant, natural, or partial peptides. Also, they may be in the form of proteins expressed on the cell surface or membrane fractions. Test samples to be used in the screening method of the present invention are not limited, but may be, for example, cell extracts, cell culture supernatants, microbial fermentation 15 products, extracts of marine organisms, plant extracts, purified or partly purified proteins, peptides, non-peptide compounds, synthetic low molecular compounds, or natural compounds. The proteins of this invention may be exposed to the sample as purified protein or soluble proteins, in a form bound to a carrier, as fusion proteins with another 20 protein, in a form expressed on the cell surface, or as membrane fractions.

A protein of the present invention may be used to screen for other proteins that bind to the target protein (such as ligands) using 25 a variety of methods known to one skilled in the art. These screening processes can be carried out, for example, by the immunoprecipitation method. Specifically, the method can be carried out as follows. The gene encoding a protein of the present invention is expressed by inserting the gene into an expression vector for foreign gene expression like pSV2neo, pcDNA I, pCD8, and such, and expressing the gene in 30 animal cells, etc. Any generally used promoters may be employed for the expression, including the SV40 early promoter (Rigby in Williamson (ed.), Genetic engineering, Vol. 3. Academic Press, London, p. 83-141 (1982)), the EF-1 α promoter (Kim et al., Gene 91, p217-223 (1990)), the CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p. 193-200 (1991)), the RSV 35 LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p. 684-704 (1987)), the SR α promoter (Takebe et al., Mol. Cell. Biol. 8, p. 466 (1988)),

the CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p. 3365-3369 (1987)), the SV40 late promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p. 385-394 (1982)), the Adenovirus late promoter (Kaufman et al, Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)),
5 the HSV TK promoter, and so on.

Transfer of a foreign gene into animal cells for its expression can be performed by any of the following methods, including the electroporation method (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987)), the calcium phosphate method (Chen, C and Okayama, H. Mol 10 Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987)), the DEAE dextran method (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4; 1642-1643 (1985)), the lipofectin method (Derijard, B. Cell 7 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K et al. Science 259, 230-234
15 (1993)), and such. A protein of the present invention can be expressed as a fusion protein having the recognition site (epitope) for a monoclonal antibody by introducing a recognition site (epitope) for a monoclonal antibody, the specificity of which has been established, into the N- or C-terminus of the protein of the present invention.
20 For this purpose, a commercial epitope-antibody system can be utilized (Experimental medicine 13, 85-90 (1995)). Vectors are commercially available which are capable of expressing fusion proteins with β-galactosidase, maltose binding protein, glutathione S-transferase, green fluorescence protein (GFP), and such, via the multi-cloning site.

25 To minimize the alteration of the properties of a protein of this invention arising from the formation into a fusion protein, a the fusion protein may be prepared by introducing only a small epitope portion comprising several to ten amino acids as reported in the literature. For example, the epitopes of polyhistidine (His-tag),
30 influenza aggregate HA, human c-myc, FLAG, Vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-GP), T7 gene 10 protein (T7-tag); human simple herpes virus glycoprotein (HSV-tag), E-tag (epitope on the monoclonal phage), and such, and monoclonal antibodies to recognize these epitopes can be utilized as the epitope-antibody system for screening proteins
35 binding to the protein of the present invention (Experimental Medicine 13, 85-90 (1995)).

In immunoprecipitation, immune complexes are formed by adding these antibodies to cell lysate prepared using suitable detergents. This immune complex consists of a protein of the present invention, a protein capable of binding to the protein, and an antibody. The 5 immunoprecipitation can also be conducted using an antibody against a protein of the present invention besides antibodies against the above epitopes. An antibody against the protein of the present invention can be prepared, for example, by inserting a gene encoding a protein of the present invention into an appropriate *E. coli* expression 10 vector to express the gene in *E. coli*, purifying the expressed protein, and immunizing rabbits, mice, rats, goats, chickens, and such, with the purified protein. The antibody can also be prepared by immunizing the above-described animals with partial peptides of the protein of 15 the present invention.

Immune complexes can be precipitated using, for example, Protein A Sepharose or Protein G Sepharose in case where the antibody is a mouse IgG antibody. In addition, in the case where the protein of the present invention is prepared as a fusion protein with the epitope of, for example, GST, and such, the immune complex can be formed using 20 a substance that specifically binds to these epitopes, such as glutathione-Sepharose 4B, and such, giving the same result as in the case where the antibody for the protein of the present invention is used.

Immunoprecipitation, in general, may be performed following, 25 or according to, for example, the method described in the literature (Harlow, E. and Lane, D.: Antibodies pp. 511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)).

SDS-PAGE is generally used for the analysis of immunoprecipitated proteins, and bound proteins can be analyzed based on the molecular 30 weight of proteins using a gel of an appropriate concentration. In this case, although proteins bound to a protein of the present invention, in general, are hardly detectable by the usual protein staining methods, such as Coomassie staining and silver staining, the detection sensitivity can be improved by culturing cells in a culture medium 35 containing radio isotope-labeled ^{35}S -methionine and ^{35}S -cysteine to label proteins inside the cells, and detecting the labeled proteins.

Once the molecular weight of the protein is determined, the desired protein can be purified directly from SDS-polyacrylamide gel and sequenced.

In addition, isolation of proteins binding to a protein of the present invention can be also performed using, for example, the West-Western blotting analysis (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90). Specifically, a cDNA library is constructed from cells, tissues, and organs in which protein binding to the protein of this invention is expected to be expressed by using phage vectors (such as, λgt11 and ZAP), proteins expressed on LB-agarose are fixed on a filter, which is then reacted with a purified and labeled protein of the present invention, and plaques expressing proteins binding to the protein of the present invention are detected by the label. Methods for labeling a protein of the invention include methods utilizing the binding of biotin and avidin, methods utilizing antibodies specifically binding to the protein of the present invention, or peptides or polypeptides (for example, GST, etc.) fused with the protein of the present invention, methods utilizing radioisotope and fluorescence, and such.

Further, another embodiment of the screening method of the present invention is exemplified by a method utilizing the two-hybrid system using cells (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends Genet. 10, 286-292 (1994); Dalton S., and Treisman R (1992) "Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element." Cell 68, 597-612; "MATCHMAKER Two-Hybrid System", "Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit", "MATCHMAKER One-Hybrid System" (all from Clontech); "HybriZAP Two-Hybrid Vector System" (Stratagene)). In the two-hybrid system, a protein of this invention may be fused to the DNA binding domain of SRF or GAL4, and expressed in yeast cells. A cDNA library is constructed from cells predicted to express proteins that bind to the protein of this invention, wherein the cDNA library is constructed in such a way that the proteins are expressed as fusion proteins with transcription activation regions of VP16 or GAL4. The cDNA library is transfected into the aforementioned yeast cells, and then positive clones are detected so as to isolate the cDNA-derived from the library (i.e., expression

of a protein that binds to the protein of the invention in yeast cell leads to the binding of the two proteins, and results in the activation of the reporter gene, which allows for the detection positive clones). The protein encoded by the isolated cDNA may be obtained by introducing 5 the cDNA into *E. coli* and expressing it therein. Thus, it is possible to prepare proteins that bind to a protein of this invention and genes encoding them. The reporter gene to be used in the two-hybrid system may be any suitable gene, such as HIS3 gene, Ade2 gene, LacZ gene, CAT gene, luciferase gene, or plasminogen activator inhibitor type I 10 (PAI-1) gene, but is not limited thereto.

Screening for compounds which bind to a protein of the present invention can be also carried out using affinity chromatography. For example, a protein of the invention is immobilized on a carrier in the affinity chromatography column, to which a test sample, which 15 is expected to express a protein binding to the protein of the invention, is applied. Samples may be, for example, cell extracts, cell lysates, etc. After loading the test sample, the column is washed, and proteins which binds to the protein of the invention can be obtained.

The obtained protein may be analyzed for its amino acid sequence 20 to synthesize oligonucleotide probes, which may then be used to screen a cDNA library to obtain a DNA encoding the protein.

A biosensor that utilizes surface plasmon resonance phenomenon 25 may be used to detect or measure the bound compound. Such biosensors (for example, BIACore (Pharmacia)) may enable the observation of the interaction at real-time using a small amount of protein without the need for labeling. Thus, it is possible to assess the interaction between the protein of the invention and test compounds using biosensors such as BIACore.

Moreover, compounds that bind to a protein of the invention 30 (including agonists and antagonists), which compounds are not always proteins, may be isolated using a variety of methods known to one skilled in the art. For instance, the protein of the invention may be fixed and exposed to synthetic compounds, a bank of natural substances, or a random phage peptide display library to screen for molecules 35 that bind to the protein. Alternatively, high-throughput screening using combinatorial chemistry techniques may be performed (Wrighton

NC; Farrel FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barret RW; Jolliffe LK; Dower WJ, "Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin", Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64; Verdine GL., "The combinatorial chemistry of nature." Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384, p11-13; Hogan JC Jr., "Directed combinatorial chemistry." Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9).

Screening of a ligand that binds to a protein of the invention may be performed as follows. The extracellular domain of a protein of the invention is fused to the intracellular domain including the transmembrane domain of a hemopoietin receptor protein that has a known signal transducing ability to prepare a chimeric receptor. The chimeric receptor may be expressed on the cell surface of a suitable cell line, preferably a cell line that can survive and proliferate only in the presence of a suitable growth proliferative factor (growth factor-dependent cell line). Then, the cell line may be cultured in medium supplemented with a sample material in which a variety of growth factors, cytokines, or hemopoietic factors might be expressed. According to this method, the growth factor-dependent cell line can only survive and proliferate when the sample contains an appropriate ligand that specifically binds to the extracellular domain of the protein of the invention. The known hemopoietin receptors, such as the thrombopoietin receptor, erythropoietin receptor, G-CSF receptor, gp130, and so on may be used. The partner for constructing a chimeric receptor for the screening system of the invention is not limited to the above receptors so long as its intracellular domain provides a structure necessary for the signal transduction activity. The growth factor-dependent cell line may be, for example, IL-3-dependent cell lines such as BaF3 or FDC-P1.

In a rare case, the ligand that specifically binds to a protein of the invention may not be a soluble protein but a membrane-bound protein. In this case, screening can be done using a protein comprising only the extracellular domain of the protein of the invention, or a fusion protein in which the extracellular domain is attached to a part of other soluble proteins. Such proteins are labeled before they are used for measuring the binding with the cells that are expected

to express the ligand. The former protein, comprising only the extracellular domain, may be a soluble receptor protein artificially constructed through introducing a stop codon into the N-terminal side of the transmembrane domain, or a soluble protein such as NR12-1.

5 The latter fusion protein may be a protein in which the Fc region of immunoglobulin, or FLAG peptide is attached to the C-terminus of the extracellular domain. These labeled soluble proteins can also be useful in detection by the above-described West-western blotting method.

10 A chimeric protein of the extracellular domain of a protein of this invention and the Fc region of an antibody (such as human IgG antibody) may be purified using Protein A column, etc. Such an antibody-like chimeric protein retains its ligand binding activity. Thus, the protein may be appropriately labeled with an isotope and
15 so on, and used for the screening of a ligand (Suda, T. et al., Cell, 175, 1169-1178 (1993)). Some cytokines, such as molecules of the TNF family, primarily exist in a membrane-bound form, so such ligands may be isolated by exposing the antibody-like chimeric protein to a variety of cells and selecting cells based on the binding activity
20 to the protein. Alternatively, ligands may be isolated according to the same method by using cells to which a cDNA library is introduced. Furthermore, the antibody-like chimeric protein may also be used as an antagonist.

The compound isolated by the above screening may be a candidate
25 for drugs that activate or inhibit the activity of a protein of this invention. It is possible to apply such compounds for the treatment of the disease arising from aberrant expression or functional disorder of a protein of the present invention. The compound obtained using the screening method of the invention includes compounds resulting
30 from the modification of the compound having the activity to bind to the protein of the invention by adding, deleting, and/or replacing a part of the structure.

When using the isolated compound or a protein of the present invention (decoy type (soluble form)) as a pharmaceutical for humans
35 and other mammals, for example, mice, rats, guinea pigs, rabbits, chicken, cats, dogs, sheep, pigs, bovines, monkeys, sacred baboons,

chimpanzees, the isolated compound can be directly administered or can be formulated into a dosage form using known pharmaceutical preparation methods. For example, according to the need, the pharmaceuticals can be taken orally, as sugar-coated tablets, capsules, 5 elixirs and microcapsules, or parenterally, in the form of injections of sterile solutions, suspensions with water, or any other pharmaceutically acceptable liquid. For example, the compounds can be mixed with a pharmacologically acceptable carrier or medium, specifically, sterilized water, physiological saline, plant-oil, 10 emulsifiers, suspending agent, surfactants, stabilizers, flavoring agents, excipients, vehicles, preservatives and binders, in a unit dosage form required for generally accepted drug implementation. The amount of active ingredient in these preparations makes a suitable dosage acquirable within the indicated range.

15 Examples of additives which can be mixed to tablets and capsules include: binders, such as gelatin, corn starch, tragacanth gum and gum acacia; excipients, such as crystalline cellulose; swelling agents, such as corn starch, gelatin and alginic acid; lubricants, such as magnesium stearate; and sweeteners, such as sucrose, lactose or 20 saccharin; flavoring agents, such as peppermint, *Gaultheria adenothrix* oil and cherry. When the unit dosage form is a capsule, a liquid carrier, such as oil, can also be included in the above ingredients. Sterile composites for injections can be formulated following normal drug implementations, using vehicles such as distilled water used for 25 injections.

For example, physiological saline, glucose, and other isotonic liquids, including adjuvants, such as D-sorbitol, D-mannose, D-mannitol, and sodium chloride, can be used as aqueous solutions for injections. These can be used in conjunction with suitable 30 solubilizers, such as alcohol, specifically ethanol, polyalcohols such as propylene glycol and polyethylene glycol, and non-ionic surfactants, such as Polysorbate 80 (TM) and HCO-50.

Sesame oil or soy-bean oil can be used as an oleaginous liquid and may be used in conjunction with benzyl benzoate or benzyl alcohol 35 as solubilizers; may be formulated with a buffer such as phosphate buffer and sodium acetate buffer; and may be used in conjunction with

a pain-killer such as procaine hydrochloride, a stabilizer such as benzyl alcohol and phenol, and an anti-oxidant. The prepared injection is filled into a suitable ampule.

Methods well known to those skilled in the art may be used to administer the pharmaceutical compound to patients, for example as intraarterial, intravenous, percutaneous injections and also as intranasal, transbronchial, intramuscular or oral administrations. The dosage varies according to the body-weight and age of the patient, the administration method, and such, but one skilled in the art can suitably select them. If said compound is encodable by a DNA, said DNA can be inserted into a vector for gene therapy to perform the therapy. The dosage and method of administration vary according to the body-weight, age, and symptoms of a patient, but one skilled in the art can select them suitably.

For example, the dosage of the protein of this invention (decoy form (soluble form)) may vary depending on the subject of administration, target organ, symptom, and method for administration. However, it may be injected to a normal adult (body weight, 60 kg) at a dose of about 100 µg to 10-20 mg per day.

For example, although there are some differences according to the symptoms, the dose of a compound that binds with a protein of the present invention, or a compound that inhibits the activity of a protein of this invention is typically about 0.1 mg to about 100 mg per day, preferably about 1.0 mg to about 50 mg per day, and more preferably about 1.0 mg to about 20 mg per day, when administered orally to a normal adult (weight 60 kg).

When the protein is administered parenterally, in the form of an injection to a normal adult (weight 60 kg), although there are some differences according to the patient, target organ, symptoms and method of administration, it is convenient to intravenously inject a dose of about 0.01 mg to about 30 mg per day, preferably about 0.1 to about 20 mg per day and more preferably about 0.1 to about 10 mg per day. Also, in the case of other animals, it is possible to administer an amount converted to 60 kg of body-weight or surface area.

35

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows the partial nucleotide sequence of AL109843 identified in the htgs database. The deduced amino acid sequence is shown under the predicted exon sequence. The YR motif sequence and WS motif that were used as the target are boxed.

5 Figure 2 shows partial amino acid sequences of NR12 found in the sequence of AL109843, and those of known hemopoietin receptors having homology thereto. Identical amino acid sequences are boxed and similar amino acid sequences are shadowed. Gap spaces are underlined. Known hemopoietin receptors are, from top, human gp130,
10 human NR9, human prolactin receptor, human IL-7 receptor, and human LIF receptor.

15 Figure 3 shows a photograph demonstrating the results of PCR analysis, showing expressed products amplified by 5'-RACE and 3'-RACE using the oligonucleotide primers designed against the predicted WS exon within the AL109843 sequence. Specific products by PCR are shown with arrows.

20 Figure 4 shows the nucleotide sequence of the full-length NR12.1 cDNA that was obtained by combining the 5'-RACE and 3'-RACE products. The deduced amino acid sequence encoded by NR12.1 is also shown. The amino acid sequence predicted to be the secretion signal is underlined. Conserved cysteine residues, and the amino acid sequences of YR motif and WS motif are boxed.

25 Figure 5 shows the nucleotide sequence of the full-length NR12.2 cDNA that was obtained by combining the 5'-RACE and 3'-RACE products. The amino acid sequence encoded by NR12.2 is also shown. The predicted secretion signal sequence is underlined. The predicted transmembrane region is shadowed. Conserved cysteine residues in the extracellular region, and amino acid sequences of YR motif and WS motif are boxed.

30 Figure 6 shows the nucleotide sequence of full-length NR12.3 cDNA that was obtained by combining the 5'-RACE and 3'-RACE products. The amino acid sequence encoded by NR12.3 is also shown. The predicted secretion signal is underlined. Conserved cysteine residues, and the amino acid sequences of YR motif and WS motif are boxed.

35 Figure 7 is a continuation of Figure 6.

 Figure 8 shows photographs demonstrating the results of RT-PCR analysis of the genetic-expression distribution of the NR12 in human

organs. The arrow indicates the size of the specific PCR amplification product of NR12.

Figure 9 shows a photograph demonstrating the results of quantification of the NR12 gene expression in human organs by Southern blotting. The arrow indicates the size of the specific signal of detected NR12.

Figure 10 is a schematic illustration of the structure of the NR12 fusion protein to be expressed from the expression vector construct in the mammalian cell.

Figure 11 shows the nucleotide sequence of full-length NR12.4 cDNA that was obtained by combining the 5'-RACE and 3'-RACE products. The amino acid sequence encoded by NR12.4 is also shown. The predicted secretion signal is underlined. Conserved cysteine residue, and amino acid sequences of YR motif and WS motif are boxed.

Figure 12 is a continuation of Figure 11.

Figure 13 shows the nucleotide sequence of full-length NR12.5 cDNA. The amino acid sequence encoded by NR12.5 is also shown. The predicted secretion signal is underlined. The predicted transmembrane sequence is shaded. Conserved cysteine residue in the extracellular region, and amino acid sequences of YR motif and WS motif are boxed.

Figure 14 is a continuation of Figure 13.

Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention will be explained below with reference to examples, but it is not construed as being limited thereto.

[Example 1] Isolation of NR12 gene

(1) Primary screening by TblastN search

Although sequencing of human genome is promoted extensively by human genome projects of institutes, the proportion of completely finished sequences to the whole human genome has not reached even 10%. However, information provided by above projects until today is counted as a good means for searching target genes, determining nucleotide sequences, and mapping genes. The informational basis of the above sequences consists of large information provided by the

assembly of bacterial artificial chromosome (BAC) and yeast artificial chromosome (YAC), which aims to form a complete database in the future. The present inventors identified a human gene encoding a part of a novel hemopoietin receptor protein from a BAC clone sequence in one 5 of public databases, "High Throughput Genomic Sequence (htgs)" of GenBank.

As mentioned above, the present inventors found motif sequences conserved in the hemopoietin receptor family, namely (Tyr/His)-Xaa-(Hydrophobic/Ala)-(Gln/Arg)-Hydrophobic-Arg motif 10 (YR motif) in the extracellular region, and Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser motif (WS motif) located around the C-terminus. However, it is extremely difficult to design oligonucleotide probe that includes both motif sequences comprehensively. Therefore, the inventors conducted *in silico* database search using partial amino acid sequences from the 15 fragment of known hemopoietin receptor proteins including both motifs as the query. Fragmentation of partial amino acid sequences that may be used as a query was examined using the human receptors shown in table 1 as the sequence of known hemopoietin receptors. According to the genomic structure of the known hemopoietin receptor sequences, 20 the exons encoding these YR motif and WS motif were about 50 to 70 amino acids long, and the exon proximal to it to the N-terminus (PP exon) was also about 50 to 70 amino acids long. Thus, a sequence containing both exons consisting of about 120 amino acids were cut to prepare a query sequence for convenience' sake. Although the length 25 of the partial amino acid sequence used as the query sequence varied depending on each known hemopoietin receptor, the feature of the structure was conserved. A sequence that ranges from one or more proline residues located near the initiation site in the PP exon to the amino acid residue located about 10 amino acids to the C-terminus 30 of the WS motif termination in the WS exon was extracted as the query sequences from all known hematopoietin receptor sequences.

The known hemopoietin receptors used as query sequences for the database search is shown in the table. The amino acid residues conserved among motif sequences are shown in bold with underline.

Table 1

Human Receptors	GenBank Accession #	YR-motif Sequence	WS-motif Sequence
LIF-R	NM_002310	XTFRIR	WSKWS
gp130	NM_002184	XVFRIR	WSDWS
IL-12R β 1	NP_005526	QEFQLR	WSKWS
IL-12R β 2	NM_001559	YEFAQIS	WSDWS
G-CSFR	NM_000760	XTLQIR	WSDWS
EPO-R	M34986	XTFAVR	WSAWS
TPO-R	M90103	XRLQLR	WSSWS
Leptin-R	U50748	XAVQVR	WSNWS
IL-3R α	M74782	XTVQIR	LSAWS
IL-4R	NM_000418	XRARVR	WSEWS
IL-5R α	M96651	XDVQVR	WSEWS
IL-6R	NM_000565	HVVQLR	WSEWS
IL-7R	NM_002185	YEIKVR	WSEWS
IL-11R α	U32324	HAVRVS	WSTWS
IL-13R α	NM_001560	NTVRIR	WSNWS
IL-2R β	A28052	YEFAQVR	WSPWS
IL-2R γ	NM_000206	XTFRVR	WSEWS
GM-CSFR	M64445	HSVKIR	WSSWS
CNTF-R	NM_001842	XIIQVA	WSDWS
PRL-R	NM_000949	XLVQVR	WSAWS
NR6(CRLF1)	NM_004750	XFVQVR	WSEWS
NR9(CREME9)	AF120151	XQFRVC	WSPWS

The above queries were used to search on the htgs database in GenBank using TblastN (Advanced TblastN 2.0.9) program. The default values (Expect=100, Descriptions=250, and Alignments=250) were used as parameters for the search. As a result, the search resulted in many false positive clones, and those clones which both of the YR

motif and WS motif were not encoded in the same reading frame, or
that contained a stop codon between the two motifs were excluded.
Also those clones containing only the YR motif but not the WS motif
were also excluded, because, as mentioned above, the YR motif is not
5 a completely established consensus sequence. Therefore, the
conservation of the WS motif was considered predominant. As a result
of the above selection, positive clones of primary search shown in
table 2 were chosen from about 1000 pseudo-positive clones obtained
by the TblastN search.

10 Positive clones obtained by the primary search against htgs
database having the target motif sequence with high probability were
selected, and are shown in the table. Conserved amino acid residues
are shown in bold with underline in the motif sequences.

Table 2

GenBank Accession #	Motif Sequence	Note
AC008048	WSPWS	IL-2R beta
AC007174	WSEWS	IL-5R
AL031406	WSTWS	CH.22
AC003656	WSGWS	CH.21
AC008663	WSKWS	CH.5
AC008614	WSGWS	CH.5
AC008532	WSGWS	CH.19
AC009267	WSTWS	CH.18
AC007596	WSSWS	CH.16
AC007227	WGEWS	CH.16
AL031123	WSDWA	CH.6
AC005911	WGEWS	CH.12
AL096870	WSNWK	CH.14
Z97201	WSNWK	CII.12
AC007902	WSGWS	CH.18
AC008536	WSMWS	CH.5
AC006176	WSGWS	CH.10
AC004846	WSQWS	none
AL109843	WQPWS	CH.1 (NR12)
AC003656	WSEHG	CH.21
AC005143	TSGWS	CH.15
AL109743	WSGWS	CH.1
AC008403	WSAWS	CH.19
AL032818	WSGWS	CH.22
Z93017	WSGWS	CH.6
AC009456	WSRWS	CH.18
AC008427	WSEGS	CH.5
AL096791	WSQWS	CH.X

(2) Secondary screening by BlastX search

First, nucleotide sequences around the sequence which were positive to the query sequence in the primary search were cut from each of the 28 positive clones of TblastN primary search shown in 5 table 2. Using these sequences as the query, the nr database in GenBank was searched again using the BlastX (Advanced BlastX 2.0.9) program. The query sequence consisted of a nucleotide sequence of 240 bp in total, which contains the sequence approximately 200 bp upstream of the sequence that may encode the WS motif, for convenience sake. 10 Because, as mentioned above, the exon encoding the WS motif was as short as approximately 50 to 70 amino acids in the genome structure of known hemopoietin receptors, the prepared query sequence of 240 bp long is expected to cover the exon sufficiently. The value of "Expect=100, Descriptions=100, Alignments=100, Filter=default" was 15 used for the BlastX search. It was expected that positive clones showing at least homology with multiple different known hemopoietin receptors would be selected as positive clones of secondary search encoding hematopoietin receptor family members from the positive clones of the secondary search according to the search.

20 As a result of the above two-step Blast search, three clones (AC008048, AC007174, and AL109843) among the human genome clones shown in table 2 were successfully identified as positive clones of the secondary search. However, AC008048 and AC007174 were revealed to be genome sequences that encode the human IL-2 receptor beta strand 25 and human IL-5 receptor, respectively. AL109843 alone was inferred to encode the target novel hemopoietin receptor. Therefore, this clone was named NR12, and was determined to isolate the full-length cDNA.

AL109843 is a genome draft sequence derived from human chromosome 1 submitted to htgs database at 16th August 1999, and has a length 30 of 149104 bp. However, nucleotide sequences at 10 positions, approximately 8000 bp in total, remains undetermined at this time. The existence of a WS exon could be predicted in the sequence of AL109843 which were positive in the TblastN primary search as shown in Figure 35 1. The YR motif, [YVFQVR] sequence , and WS motif, [WQPWS] sequence, was recognized in the sequence. The comparison of the amino acid sequence of NR12 to that of the known hematopoietin receptor, which

were detected to have homology in BlastX secondary search, are shown in Figure 2. Based on the above result, specific oligonucleotide primers were designed on the exon sequence that were predicted in the AL109843 sequence, and these primers were used in the 5'-RACE
5 method and the 3'-RACE method described later on.

(3) Design of oligonucleotide primers

As described above, exon sites were predicted on AL109843 sequences, and these were used to design the following oligonucleotide primers specific for NR12. Three sense primers (NR12-S1, NR12-S2, 10 and NR12-S3; oriented downstream) and three antisense primers (NR12-A1, NR12-A2, and NR12-A3; oriented upstream) were synthesized using the ABI 394 DNA/RNA synthesizer under a condition to attach a trityl group to the 5'-terminus. Then, the products were purified using an OPC column (ABI #400771) to obtain full-length primers.
15

NR12-S1; 5'- GCA ACA GTC AGA ATT CTA CTT GGA GCC -3' (SEQ ID NO:
11)

NR12-S2; 5'- CAT TAA GTA CGT ATT TCA AGT GAG ATG TC -3' (SEQ ID NO: 12)

NR12-S3; 5'- GGT ACT GGC AGC CTT GGA GTT CAC TG -3' (SEQ ID NO:
20 13)

NR12-A1; 5'- CAG TGA ACT CCA AGG CTG CCA GTA CC -3' (SEQ ID NO:
14)

NR12-A2; 5'- GAC ATC TCA CTT GAA ATA CGT ACT TAA TG -3' (SEQ ID NO: 15)

NR12-A3; 5'- GGC TCC AAG TAG AAT TCT GAC TGT TGC -3' (SEQ ID NO:
25 16)

Above oligonucleotide primers, NR12-S1 and NR12-A3, NR12-S2 and NR12-A2, and NR12-S3 and NR12-A1 were designed to have completely complementary sequence to each other.

(4) Cloning of N-terminal cDNA by 5'-RACE method

In order to isolate full-length cDNA of NR12, 5'-RACE PCR was performed using NR12-A1 of (3) for primary PCR, and NR12-A2 of (3) for secondary PCR, respectively. PCR experiment was performed using Human Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7403-1) as 35 the template, and Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#8417-1) on the thermal cycler (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400). Under

the following conditions, as a result, PCR products of two different sizes were obtained as shown in Figure 3.

Condition of the primary PCR was as follows: 94°C for 4 min, 5 cycles of "94°C for 20 sec, 72°C for 90 sec", 5 cycles of "94°C for 20 sec, 70°C for 90 sec", 28 cycles of "94°C for 20 sec, 68°C for 90 sec", 72°C for 3 min, and termination at 4°C.

Condition of the secondary PCR was as follows: 94°C for 4 min, 5 cycles of "94°C for 20 sec, 70°C for 90 sec", 25 cycles of "94°C for 20 sec, 68°C for 90 sec", 72°C for 3 min, and termination at 4°C.

Two amplification products were obtained by the PCR and both of them were subcloned into pGEM-T Easy vector (Promega #A1360), and the nucleotide sequences were determined. The transformation of the PCR product into the pGEM-T Easy vector was performed using T4 DNA ligase (Promega#1360) in a reaction at 4°C of 12 hours. Recombinants of the PCR products and pGEM-T Easy vector were obtained by the transformation of *E. coli* DH5 α strain (Toyobo#DNA-903). Recombinants were selected by using Insert Check Ready Blue (Toyobo#PIK-201). The nucleotide sequences were determined using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI/Perkin Elmer#4303154) and by analyzing with the ABI PRISM 377 DNA Sequencer. Nucleotide sequences of the whole insert fragment of 10 independent clones were determined. As a result, they were divided into two groups, one consisting of 4 clones with a size of 1.3 kb, and the other consisting of 6 clones with a size of 1.0 kb, based on the length of the base pairs and the differences in sequence. However, the former 5'-RACE PCR products of 1.3 kb were revealed to be non-specific PCR amplification products. This sequence is derived from the minor band shown in Figure 3. On the other hand, the latter 5'-RACE PCR products of 1.0 kb were recognized as partial nucleotide sequences of NR12 that resulted from a correct PCR amplification reaction.

(5) Cloning of C-terminal cDNA by 3'-RACE method

To isolate the C-terminal sequence of a cDNA clone corresponding to the full-length NR12, 3'-RACE PCR was performed using NR12-S1 primer of (3) for the primary PCR, and NR12-A2 of (3) for secondary PCR, respectively. The PCR was performed under the same condition as in the 5'-RACE above except the Human Thymus Marathon-Ready cDNA Library

(Clontech#7415-1) was used as the template. More specifically, Advantage cDNA Polymerase Mix and the Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 thermalcycler was used in the PCR experiment. Under the same PCR condition to those described in (4), 3'-RACE amplification product showing an identical size of 750 bp was obtained as shown in Figure 3. The obtained PCR product was subcloned into the pGEM-T Easy vector as above to determine the nucleotide sequence. The recombination of the PCR product into the pGEM-T Easy vector was performed using T4 DNA ligase in a reaction at 4°C for 12 hours. The recombinant of the PCR product and pGEM-T Easy vector was obtained by transformation of *E. coli* DH5α strain, and selection of the recombinant was done using Insert Check Ready Blue as described above. The nucleotide sequence was determined using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and the ABI PRISM 377 DNA Sequencer for analysis. The nucleotide sequences of the whole insert fragment from 2 independent clones of genetic recombinants revealed that the clones contain the C-terminal sequence of the full-length NR12 cDNA clone having a poly A sequence.

Then, the nucleotide sequence determined by the 3'-RACE-PCR and those determined by 5'-RACE-PCR in (4) were combined to finally determine the whole nucleotide sequence of the cDNA clone encoding the secretory form soluble receptor-like protein named NR12.1. The determined nucleotide sequence of NR12.1 cDNA (SEQ ID NO: 1) and the amino acid sequence encoded by the sequence (SEQ ID NO: 2) are shown in Figure 4.

(6) Cloning of a C-terminal splicing variant by 3'-RACE method

Although the NR12.1 clone isolated above had sufficient feature of known hemopoietin receptors according to the result of structural analysis, it did not possess a transmembrane region. Therefore, it was inferred to encode a soluble receptor-like protein as above-mentioned. Further, the present inventors predicted the existence of splicing variants that have a transmembrane region especially in the C-terminal region of the transcription product of the present gene, and tried to isolate NR12 cDNA clones by successive 3'-RACE method.

Thus, 3'-RACE PCR was performed using the above-mentioned NR12-S2

primer of (3) for primary PCR, and NR12-S3 primer for secondary PCR. Under the same PCR condition to those described in (4) for 5'-RACE method except using Human Testis Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7414-1) as the template. As a result, multiple 3'-RACE PCR products with different sizes were obtained. All of the obtained PCR products were subcloned into the pGEM-T Easy vector as described above to determine the nucleotide sequences. Nucleotide sequences of the whole insert fragments of 6 independent clones of genetic recombinants were determined. As a result, one of these clones was found to be identical to NR12.1 determined above. The other 5 clones were possible to encode the target transmembrane protein having transmembrane regions. That is, the present inventors were able to confirm the existence of splicing variants of NR12 as expected. Furthermore, the 5 cDNA clones above showed differences in the C-terminal extracellular region due to alternative splicing. Namely, two of these clones had only a short intracellular region and were named NR12.2. On the other hand, the other 3 clones had a long intracellular region. These cDNA clones with a long ORF were named NR12.3, and were distinguished from the above sequence, NR12.2.

Then, the nucleotide sequence determined by the 3'-RACE PCR and those from the 5'-RACE PCR products in (4) were combined to finally determine the whole nucleotide sequence of the cDNA clone that encodes the transmembrane receptor protein. The nucleotide sequence determined for NR12.2 cDNA (SEQ ID NO: 3) and its amino acid sequence (SEQ ID NO: 4) are shown in Figure 5. The nucleotide sequence of NR12.3 cDNA (SEQ ID NO: 5) and its amino acid sequence (SEQ ID NO: 6) are shown in Figure 6 and 7.

The exon site sequence was predicted in above (2) from the splicing consensus sequence in RNA transcription (Hames, B.D. and Glover, D.M., Transcription and Splicing (Oxford, IRL Press), 1988, p131-206) and not by using program such as genome analysis software. According to the determination of the whole nucleotide sequence of isolated cDNA clones, it was revealed that the exon site predicted within the partial sequence of AL109843 shown in Figure 1 correspond completely to that observed in the actual transcription of the NR12 gene. However, it was revealed that only the transcription product of NR12.1 cDNA clone

was one which elongates to the 3'-untranslated region read through the identical sequence as that of the genome structure without splicing after the termination of WS exon.

(7) Structural feature of NR12 and prediction of its function

As a result of the determination of the whole nucleotide sequences of NR12.1, NR12.2 and NR12.3, it was revealed that they are the transcription products having structural variety in the C-terminus due to alternative splicing. The NR12.1 may encode a secretory form soluble hemopoietin receptor-like protein consisting of 337 amino acids according to its primary structure, while the NR12.2 and NR12.3 may encode transmembrane hemopoietin receptor proteins consisting of 428 and 629 amino acids, respectively. The characteristics of each NR12 were as follows.

First, it is predicted that the sequence from the 1st Met to the 23rd Gly in the common extracellular domain of these clones is the typical secretion signal sequence. Herein, the first Met is presumed to be the translation initiation site because there exists an in-frame termination codon at the minus 32 position from the 1st Met. Next, an Ig-like region exists in the region from the 24th Gly to the 124th Pro residue. In addition, it is predicted that the region from the 133rd Cys to the 144th Cys residue forms one of the loop structures which is a ligand-binding site. Furthermore, the region from the 290th Tyr to the 295th Arg residue corresponds to the highly conserved YR motif, and a typical WS motif is also found at residues from the 304th Trp to 308th Ser.

Herein, the NR12.1 encodes 29 amino acids after the WS motif and the translation frame terminates at the next stop codon. Therefore, the NR12.1 encodes a soluble hemopoietin receptor protein that does not have a transmembrane domain. On the other hand, the 26 amino acids following the conserved motif above from the 352nd Gly to the 377th Asn residue in NR12.2 and NR12.3 correspond to a typical transmembrane domain. The NR12.2 and NR12.3 encode identical amino acid sequences to the 413th Gln residue in the extracellular region. However, structural differences exist in the C-terminal region following the 413th Gln residue due to alternative splicing which connects them to different exons. Namely, NR12.2 encodes 428 amino acids and the

translation frame is terminated at the next stop codon. Thus, it has only a short intracellular region consisting of 51 amino acids. On the other hand, NR12.3 encodes 629 amino acids and has an intracellular region consisting of 252 amino acids. According to the structural
5 characteristics above, NR12 gene was recognized to possess sufficient characteristics as novel hemopoietin receptor proteins.

[Example 2] Tissue distribution determination and expression pattern analysis of NR12 gene by RT-PCR

10 mRNA was detected using the RT-PCR method to analyze the expression distribution and the expression pattern of NR12.1 gene in different human organs. NR12-PPD primer with the sequence below was synthesized as a sense primer (downstream orientation) for the RT-PCR analysis. NR12-A1 primer synthesized in Example 1 (3) was used as the antisense
15 primer (upstream orientation). The NR12-PPD primer was synthesized and purified as in Example 1 (3). It was expected that the common N-terminal region in all splice variants, NR12.1, NR12.2 and NR12.3, are amplified and detected using these primer sets (NR12-PPD and NR12-A1).

20 hNR12-PPD ; 5'- CCG CCA GAT ATT CCT GAT GAA GTA ACC -3' (SEQ ID NO : 17)

The templates used were Human Multiple Tissue cDNA (MTC) Panel
25 I (Clontech #K1420-1), Human MTC Panel II (Clontech#K1421-1), Human Immune System MTC Panel (Clontech#K1426-1), and Human Fetal MTC Panel (Clontech#K1425-1). PCR was performed using Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#8417-1) on a thermal cycler (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400). PCR was performed by following condition
30 to amplify the target gene: 94°C for 4 min, 5 cycles of "94°C for 20 sec, 72°C for 1 min", 5 cycles of "94°C for 20 sec, 70°C for 1 min", 25 cycles of "94°C for 20 sec, 68°C for 1 min", 72°C for 3 min, and termination at 4°C.

As shown in Figure 8, strong expression of NR12 was observed
35 in the hematopoietic cell line tissue and immune system cell line tissue such as adult spleen, thymus, lymph node, bone marrow, and

5 peripheral leukocyte. Expression was also detected in testis, liver, lung, kidney, pancreas, and gastrointestinal tract such as small intestine and colon. Moreover, NR12 gene expression was also observed in all analyzed mRNA derived from human fatal tissues. Performing PCR using human G3PDH primers under the above condition and detecting the expression of the housekeeping gene G3PDH, it was confirmed that the number of mRNA copies among the template mRNA had been normalized.

10 The size of the RT-PCR amplification product was 561 bp, which was consistent with the size calculated from the determined nucleotide sequence of NR12 cDNA. Thus, the product was considered to be the product of specific PCR amplification reaction. This was further confirmed by Southern blotting as in the following, and the possibility that the product was a non-specific PCR amplification product was denied.

15 The analyses of expression distribution and expression pattern of NR12 gene by RT-PCR revealed that the expression is restricted to specific organs and tissues, and also that the amount of expression varies greatly among organs. Taking all the result of NR12 gene expression distribution together, the fact that especially strong expression was detected in tissue considered mainly to include immunocyte tissues and hematopoietic cells suggest strongly the possibility that NR12 functions as a novel hemopoietin receptor. Furthermore, the fact that the expression of NR12 was also observed in other tissues suggests that NR12 can regulate various physiological 20 functions *in vivo* not only those in the immune system and hematopoietic system.

25 Moreover, existence of splicing variants was recognized. This strongly suggests that transcriptional regulation of the NR12 gene expression is strictly controlled by the transcriptional regulation determining functional specificity, transcriptional induction by exogenous stimulating factor, and regulation of alternative splicing in specific cell types.

30 [Example 3] Verification of the specificity of RT-PCR product by Southern blotting

35 In order to verify the specificity of amplification, the RT-PCR

amplified target gene product in Example 2 was subjected to Southern blotting using NR12 specific cDNA fragment as a probe. At the same time, the amount of RT-PCR product was quantitatively detected by the strength of labeled signal to assess relative gene expression
5 levels among different human organs. The RT-PCR product was electrophoresed on an agarose gel, blotted onto a charged nylon membrane, Hybond N (+) (Amersham, cat#RPN303B), and was subjected to hybridization. The 5'-RACE PCR product cDNA fragment corresponding to the N-terminus of the NR12 obtained in Example 1 (4) was used as
10 a probe specific to NR12. Probes were prepared using the Mega Prime Kit (Amersham, cat#RPN1607), and labeled with radioisotope, [α -³²P] dCTP (Amersham, cat#AA0005). Hybridization was performed using Express Hyb Hybridization Solution (Clontech#8015-2), and after the prehybridization at 68°C for 30 min, heat-denatured labeled probe
15 was added to conduct hybridization at 68°C for 120 min. After subsequent wash in (1) 1x SSC/0.1% SDS at room temperature for 5 min; (2) 1x SSC/0.1% SDS at 50°C for 30 min; and (3) 0.1x SSC/0.1% SDS at 50°C for 30 min, the membrane was exposed to Imaging Plate (FUJI#BAS-III), and NR12 specific signal was detected by the Image
20 Analyzer (FUJIX, BAS-2000 II).

As shown in Figure 9, all the amplified PCR products by the RT-PCR above were verified as specific amplification products. Furthermore, the result of quantification of relative expression level among each tissue also supported above-mentioned assessment. The detection
25 method for target gene expression using RT-PCR and Southern blotting in combination is known to have extremely high sensitivity as compared to other methods for expression analysis. Nevertheless, NR12 gene expression was not detected in adult heart, skeletal muscle, adult brain, prostate, ovary, or placenta at all.
30

[Example 4] Northern blot analysis of NR12 gene expression

Northern blot analysis of NR12 gene expression was performed to examine the expression pattern of NR12 gene in human organs and human cancer cell lines, and to determine the size of NR12 transcripts.
35 Human Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (Clontech#7760-1), Human MTN Blot II (Clontech#7759-1), Human MTN Blot III (Clontech#7767-1),

and Human Cancer Cell Line MTN Blot (Clontech#7757-1) were used.

The cDNA fragment obtained by 5'-RACE in Example 1 (4) was used as the probe. The probe was prepared using Mega Prime Kit and radio-labeled with [α -³²P]dCTP as in Example 3. Hybridization was 5 performed using Express Hybridization Solution, and after prehybridization at 65°C for 30 min heat-denatured labeled probe was added to conduct hybridization at 65°C for 16 hr. After subsequent wash in (1) 1x SSC/0.1% SDS at room temperature for 5 min; (2) 1x 10 SSC/0.1% SDS at 48°C for 30 min; and (3) 0.5x SSC/0.1% SDS at 48°C for 30 min; the membrane was exposed to an Imaging Plate as above, and an attempt to detect NR12 specific signal was made using an Image Analyzer.

The method failed to detect any signal in any of the examined human organs. This could be because Northern blotting has a significant 15 lower sensitivity than RT-PCR and thus failed to detect mRNA with low expression level.

[Example 5] Construction of an NR12 ligand screening system using growth factor-dependent cell lines

20 Ligands that bind specifically to the protein of this invention can be screened by the following step: (1) preparing a chimeric receptor by ligating the extracellular domain of the protein of this invention with the intracellular domain containing the transmembrane domain of a hemopoietin receptor protein comprising a known signal 25 transduction ability; (2) expressing this chimeric receptor on the cell surface of a suitable cell line, preferably, a cell line that can survive and proliferate only under the presence of a suitable factor (a growth factor-dependent cell line); and (3) culturing the cell line by adding a material that is expected to contain various 30 growth factors, cytokines, or hemopoietic factors. This method utilizes the fact that the above-mentioned growth factor-dependent cell line only survives and proliferates when a ligand specifically binding to the extracellular domain of the protein of the invention exists within the test material and is killed rapidly without the 35 existence of the growth factor. Known hemopoietic receptors are, for example, the thrombopoietin receptor, erythropoietin receptor, G-CSF

receptor, gp130, etc. However, the partner of the chimeric receptor used in the screening of the invention is not limited to these known hemopoietic receptors, and any receptor may be used so long as it contains the structure necessary for the signal transducing activity in the cytoplasmic domain. IL-3-dependent cell lines, such as Ba/F3 and FDC-P1, can be exemplified as growth factor-dependent cell lines.

First, the cDNA sequence encoding the extracellular region of NR12 (the amino acid sequence from the 1st Met to the 319th Gly) was amplified by PCR, and this DNA fragment was bound in frame to the DNA fragments encoding the transmembrane region and the intracellular region of a known hemopoietin receptor to prepare a fusion sequence encoding a chimeric receptor. The TPO receptor (Human MPL-P) was selected from the candidates described above as the known partner hemopoietin receptor. The constructed chimeric receptor sequence above was inserted into the plasmid vector, pME18S/neo, which can be expressed in mammalian cells. A schematic diagram of the structure of the constructed pME18S/NR12-TPOR chimeric receptor is shown in Figure 10. The chimeric receptor-expressing vector was introduced into the growth factor-dependent cell line Ba/F3, and was forced to express. Then, stable gene-introduced cells were selected. The selection can be done by utilizing the fact that the expression vector contains a drug (neomycin) resistant gene, and thus, only gene-introduced cells that obtained drug tolerance can be proliferated in the culture containing the drug. Novel hematopoietin may be screened by constructing a screening system that utilizes the ability of the chimeric receptor-expressing cell lines to survive and proliferate only under the existence of a ligand functionally binding specifically to the NR12. In this case, the culture of the chimeric receptor-expressing cell line is conducted in medium supplemented with a material expected to include a target ligand in place of the growth factor (IL-3, in this case) free medium described above.

[Example 6] Construction of an expression system of secretary and soluble recombinant NR12 protein

Though rare, cell membrane-binding proteins except soluble proteins can be envisaged as a ligand specifically binding to the

protein of the invention. In such cases, screening can be done by labeling the protein containing only the extracellular domain of the protein of the invention, or a fusion protein in which a partial sequence of another soluble protein is added to the extracellular domain of the present protein, and then, measuring the binding with cells expected to express the ligand.

Examples of the former proteins containing only the extracellular domain of the protein of the invention are, for example, soluble receptor proteins artificially prepared by inserting a stop codon to the N-terminal side of the transmembrane domain, or NR12.1 that encodes the soluble type protein of NR12. On the other hand, the latter proteins may be prepared by adding labeling peptide sequences such as Fc site of immunoglobulins, and FLAG peptide to the C-terminus of the extracellular domain of the protein of the invention. These soluble labeled proteins can be also used for the detection in the West-western blotting method.

The present inventors selected a construction method as follows: (1) cDNA sequence encoding the extracellular region of NR12 (amino acid sequence from the 1st Met to the 319th Gly) was amplified by PCR; and (2) FLAG peptide sequence was added in frame to the C-terminus of the amplified DNA fragment to obtain a sequence encoding the soluble targeted protein. The constructed sequence was inserted into the plasmid vector, pCHO, which can be expressed in mammalian cells. A schematic diagram of the structure of the constructed pCHO/NR12-TPOR chimeric receptor is shown in Figure 10. This expression vector was introduced into mammalian cells, CHO cells, and was forced to express. Then, stable gene-introduced cells were selected. After confirming expression of the soluble protein, the expression cells were cultured in large scale. The recombinant protein secreted into the culture supernatant can be immunoprecipitated using anti-FLAG peptide antibody, and may be purified by affinity columns, etc.

The obtained recombinant protein can be applied not only for the assay mentioned above, but also, for example, for detection of specific bidding activity within a material expected to contain a target ligand by BIA-CORE system (Pharmacia). Thus, it is extremely important for searching novel hemopoietins that can bind to NR12.

[Example 7] Reisolation of human full-length NR12 CDS

(1) Design of oligonucleotide primers

The present inventors already had succeeded in isolating the
5 full-length cDNA of NR12 gene. However, the N-terminal sequence and
C-terminal sequence of the isolated target gene were isolated
separately due to the use of 5'-RACE and 3'-RACE method for the cDNA
isolation. Thus, the present inventors attempted to reisolate NR12.2
and NR12.3 genes that contain continuous full-length coding sequences.

10 First, a sense primer (NR12.2-MET) described below that contains
the start codon, Met sequence, with a common nucleotide sequence to
each cDNA clone of NR12 was designed. As the antisense primers,
NR12.2-STP and NR12.3-STP that contain a stop codon specific to NR12.2
and NR12.3, respectively, were designed. The primers were synthesis
15 as in Example 1 (3). More specifically, ABI's 394 DNA/RNA Synthesizer
was used for the primer synthesis under the condition where a trityl
group is attached to the 5'-terminus. Then, the product was purified
using and OPC column (ABI#400771) to obtain full-length primers.
NR12.1-MET; 5'- ATG AAT CAG GTC ACT ATT CAA TGG -3' (SEQ ID NO: 18)
20 NR12.2-STP; 5'- GCA GTC CTC CTA CTT CAG CTT CCC -3' (SEQ ID NO: 19)
NR12.3-STP; 5'- TTG ATT TTG ACC ACA CAG CTC TAC -3' (SEQ ID NO: 20)

(2) PCR cloning

In order to isolate the full-length CDS of NR12, PCR cloning
was performed using NR12.1-MET primer of (1) as sense primer and
25 NR12.2-STP and NR12.3-STP primer as antisense primers, respectively.
Human Thymus Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7415-1) was used
as the template, and Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#8417-1)
for the PCR experiment on a thermal cycler (Perkin Elmer Gene Amp
30 PCR System 2400) under the condition described below. The PCR product
of 1301 bp named NR12.4 was obtained using the primer set "NR12.1-MET
and NR12.2-STP", and that of 1910 bp named NR12.5 was obtained using
the primer set "NR12.1-MET and NR12.3-STP".

PCR was performed by a single cycle of "94°C for 4 min", 5 cycles
of "94°C for 20 sec, 72°C for 90 sec", 5 cycles of "94°C for 20 sec,
35 70°C for 90 sec", 28 cycles of "94°C for 20 sec, 68°C for 90 sec",
a single cycle of "72°C for 3 min", and was terminated at 4°C.

The obtained PCR products were subcloned into pGEM-T Easy vectors (Promega #A1360) as in Example 1 (4), and the nucleotide sequences were determined. Recombination of the PCR products into the pGEM-T Easy vectors were performed using T4 DNA ligase (Promega#1360) in 5 a reaction at 4°C for 12 hours. The recombinant of the PCR product and the pGEM-T Easy vector was obtained by transformation of *E. coli* strain DH5 α (Toyobo#DNA-903), and Insert Check Ready Blue (Toyobo#PIK-201) was used for the selection of the genetic recombinant. The nucleotide sequence was determined using the BigDye Terminator 10 Cycle Sequencing SF Ready Reaction Kit (ABI/Perkin Elmer#4303150) and was analyzed by the ABI PRISM 377 DNA Sequencer. The nucleotide sequence of the insert fragments in respective recombinants of NR12.4 and NR12.5 were analyzed, and the sequences of cDNA clones that may encode the full-length CDS were determined.

15 As a result, it was revealed that NR12.4 contains the full-length ORF of NR12.2 but not the 5'-untranslated region or 3'-untranslated region except the sequence derived from primers due to the design of the used primers in the PCR. NR12.5 also contained the full-length ORF of NR12.3 but not the 5'-untranslated region or 3'-untranslated 20 region except the sequence derived from the primers. The determined nucleotide sequence of NR12.4 and its amino acid sequence are shown in Figure 11 and 12, and the determined nucleotide sequence of NR12.5 and its amino acid sequence are shown in Figure 13 and 14.

25 *E. coli* strain DH5 α transfected with pGEM-T Easy vector (pGEM/NR12.5CDS) that contains the NR12.5 cDNA of this invention was deposited internationally on 31st July 2000 as follows.

Name and Address of the depositary institution

30 Depositary institution: National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry.

Address: 1-1-3 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan.

Deposition date: 31st July 2000

Accession No.: FERM BP-7259

(1) Preparation of a probe fragment of human NR12

Aiming to analyze the genomic structure of mouse NR12 gene, the present inventors performed plaque hybridization against the mouse genomic DNA library. To perform heterologous cross hybridization 5 cloning against mouse genomic DNA library, probe fragment of human NR12 cDNA was prepared. The insert fragment cut out with Not I from the 5'-RACE product of human NR12 obtained in Example 1 (4) was purified, and used as the probe fragment. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN#28704) was used to extract and purify the insert fragment 10 from the agarose gel. The probe was radiolabeled with [α -³²P] dCTP using Mega Prime Kit as in Example 3, and was used for plaque hybridization.

(2) Plaque hybridization

Mouse 129SVJ strain Genomic DNA (Stratagene #946313) constructed 15 in Lambda FIX II was used as the library. A genomic library of approximately 320 thousand plaques was developed in NZY agar medium, and the plaques were blotted onto a Hybond N (+) (Amersham #RPN303B) charged nylon membrane to conduct primary screening. Perfect-Hyb Solution (Toyobo#HYB-101) was used for hybridization, and after 20 prehybridization at 60°C for 30 min, heat-denatured labeled probe was added, and hybridization was conducted at 60°C for 16 hr. After subsequent wash in: (1) 1x SSC/0.1% SDS at room temperature for 5 min; (2) 1x SSC/0.1% SDS at 50°C for 30 min; and (3) 0.5x SSC/0.1% SDS at 50°C 30 min, the membrane was exposed to an X-ray film (Hyperfilm 25 MP: Amersham, #RPN8H) to detect mouse NR21 positive plaques.

As a result, 6 independent positive or pseudo-positive clones were obtained. The inventors succeeded in isolating plaques of 2 independent NR12 positive clones by performing secondary screening in a similar way to the primary screening against these 6 clones obtained 30 by the primary screening. Lambda DNA of the isolated plaque was prepared in large scale by plate-lysing method. The insert fragments were cut out with restriction enzyme Sal I. Analysis of their size revealed that the fragments were approximately 18.5 kb and 16.0 kb, respectively.

The present invention provides novel hemopoietin receptor proteins and DNA encoding same. The present invention also provides: a vector into which the DNA has been inserted, a transformant harboring the DNA, and a method for producing recombinant proteins using the 5 transformant. It further provides a method of screening for a compound or a natural ligand that binds to the protein. The protein of this invention is predicted to be associated with the regulation of immune system and hematopoiesis. Therefore, the proteins of this invention are expected to be useful in understanding immune responses and 10 fundamental features of hematopoiesis *in vivo*. It is also expected that the proteins of the present invention can be used in the diagnosis and treatment of diseases related to immunity and hematopoiesis.

It is important to isolate unknown hematopoietic factors that can bind to the NR12 molecule of this invention. The gene of this 15 invention is thought to be extremely useful in the screening of such unknown factors. Furthermore, peptide libraries and synthetic chemical materials may be searched to isolate and identify agonists and antagonists that can functionally bind to the NR12.

As described above, the NR12 gene is expected to provide a useful 20 source for obtaining unknown hematopoietic factors or agonists that are capable of functionally binding to the receptor protein encoded by the NR12 gene. It is expected that cellular immunity and hematopoietic function *in vivo* will be enhanced by the administration of such functionally binding substances or specific antibodies that 25 can activate the function of NR12 molecule to the organism. Thus, the NR12 gene facilitates the development of drugs for clinical application that promote proliferation or differentiation of the immune cells or hematopoietic cells, or that activates the function of immune cells. Such drugs may be used to enhance cytotoxic immunity 30 against specific types of tumor. It is possible that NR12 is expressed in a restricted population of cells in the hematopoietic tissues. Accordingly, anti-NR12 antibodies would be useful in the isolation of such cell populations, which may then be used in cell transplantation treatments.

35 On the other hand, NR12.1, a splice variant of NR12, may be used as an inhibitor for the NR12 ligand, as a decoy type receptor. Further,

it is expected that by administering antagonists that can bind functionally to the NR12 molecule, or other inhibitors, as well as specific antibodies that can inhibit the molecular function of NR12 to the organism, one can potentially suppress cellular immunity or
5 inhibit the proliferation of hematopoietic cells *in vivo*. Thus, such inhibitors may be applied as drugs for clinical application for use as, for example, proliferation inhibitors of immune cell and hematopoietic cell, differentiation inhibitors, immunosuppressive drugs, and anti-inflammatory drugs. Specifically, such inhibitors
10 may be used to suppress the onset of autoimmune diseases arising from autoimmunity, or tissue rejection by the immune system of the living body, the primary problem in transplantation. Furthermore, the inhibitors may be effectively used to treat diseases caused by such aberrant promotion of immune response. Thus, the inhibitors may be
15 used to treat a variety of allergies that are specific to particular antigens, such as metal and pollen.

CLAIMS

1. A DNA selected from the group consisting of:
 - (a) a DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, and 10;
 - (b) a DNA comprising the coding region of the nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, and 9;
 - (c) a DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, and 10, in which one or more amino acids are modified by substitution, deletion, insertion, and/or addition, wherein said protein is functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, and 10; and,
 - (d) a DNA hybridizing under stringent conditions with a DNA consisting of the nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, and 9, and encoding a protein that is functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, and 10.
2. A DNA encoding a partial peptide of a protein consisting of the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, and 10.
3. A protein or peptide that is encoded by the DNA described in claim 1 or claim 2.
4. A vector into which the DNA described in claim 1 or claim 2 is inserted.
5. A transformant harboring the DNA described in claim 1 or claim 2, or the vector described in claim 4.
6. A method for producing the protein or peptide of claim 3, comprising the steps of: culturing said transformant of claim 5, and recovering the expressed protein from said transformant or the culture supernatant.
7. An antibody binding to the protein of claim 3.
8. A polynucleotide complementary to either a DNA that comprises the nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, and 9 or its complementary strand, wherein the polynucleotide comprises at least 15 nucleotides.
9. A method of screening for a compound that binds to the protein

of (3), comprising the steps of:

(a) contacting a test sample with said protein or partial peptide thereof;

5 (b) detecting the binding activity of the test sample with the protein or partial peptide thereof; and,

(c) selecting the compound that binds to the protein or partial peptide thereof.

ABSTRACT

A novel hemopoietin receptor gene (NR12) was successfully isolated by extracting motifs conserved among the amino acid sequences 5 of known hemopoietin receptors and by using the predicted sequence. The NR12 gene encodes two forms of proteins, a transmembrane type and a soluble type. The expression of the NR12 gene was detected in tissues containing hematopoietic cells. NR12 is a novel hemopoietin receptor molecule involved in the regulation of immune system and 10 hematopoiesis *in vivo*. Thus, NR12 is useful in the search for novel hematopoietic factors that functionally bind to the NR12 receptor, and in the development of therapeutic drugs for diseases associated with immunity or hematopoiesis.

Figure 1

61 tgttccatacatttctgctaaaaataatggttttaaaaggcacaccattttat

121 tggtaaccatccatttttagGTTAAAGAATTGACACCAATTACATATGGAAACAGTC
ValIleSerGluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSer

181 AGAATTCTACTTGAGGCCAACATTAAGTACGTATTCAACTGAGATGTCAGAACAGG
GluPheTyrlLeuGluProAsnIleLys**TerValPheGlnValArgCysGlnGluThrGly**

241 CAAAGGTACTGGCAGGCCTTGGAGTCACGTTTCACTGTTTCAAAACACCTGAAACAGgtga
LysArgTyrTerGlnProtPseSerLeuPheHisLysThrProGluThr

Figure 2

hNR12	LIEPNITKIVFVRC-QEINGKRYWQPS
gp130	LIEPFTKIVFPTRCMKEDGRGCVNSDWG
hNR12	QIEPNITKIVFVRC-Q-EIGKRYWQPS
hNR 9	HIDPNIDYQFRV-CARGD-GREEMSPWS
hNR12	QQSEFY---IEPNITKIVFQVRCQETGKRYWQPS
hPRLR	QQNEEFKILSIHPGQKYIIVQVRC-PDHGYWSAMSPATEFQIP
hNR12	TNFIFYQPSSEFYIEPNITKIV-YFQVRC-QE-TGKRYWQPS-SLFFHKTPE
hIL7R	TKITLICR-X-EPPAMYE-T-VRSIDHYFKGMSEWSPS-XERFPE
hNR12	LIEPN-TIKIVFVRCQ-ETG-KRYWQPS-SLFFHKTPE
hIFR	TNPVYI-VIETFRCSSTEFWK--WSKWSVKQHLTPE

3 / 1 4

Figure 3

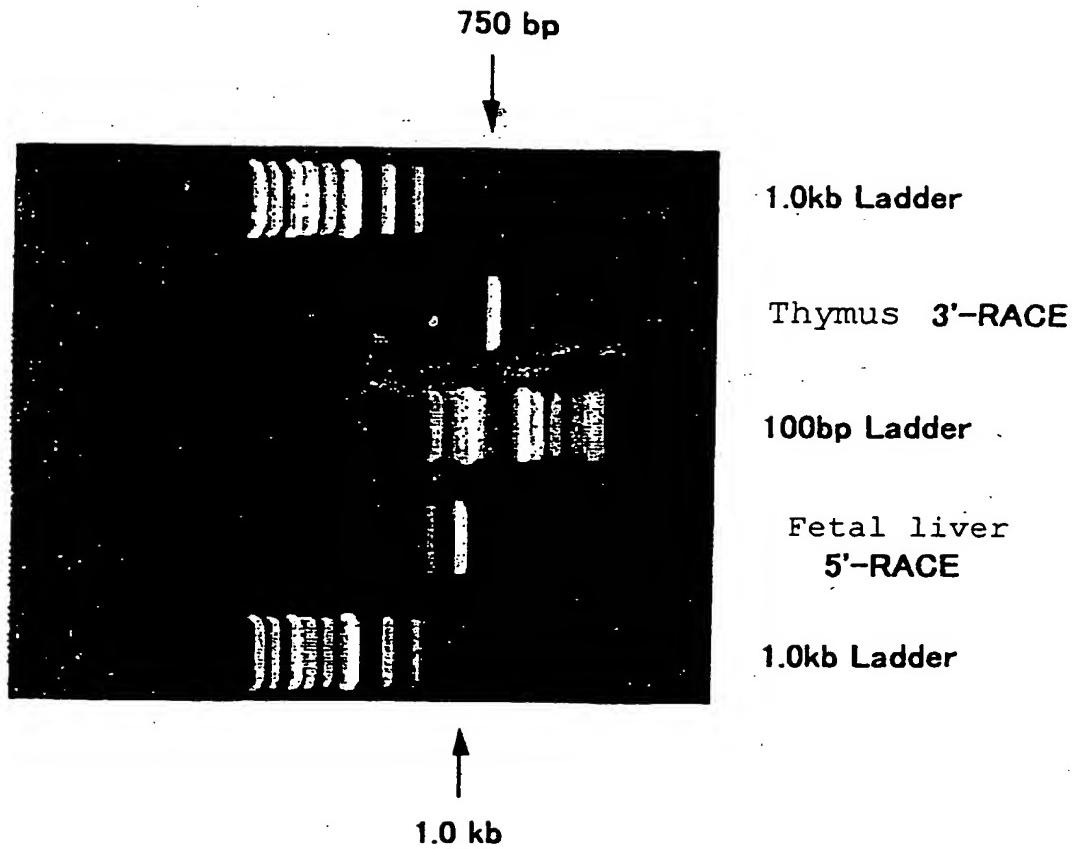


Figure 4

1 ATGACACAGCCAACAAGGGTGGCAGCCTGGCTCTGAAGTGGATTATGTGCTTCAAACAG
 61 GTTAAAAGAGGGAAACAGTCTTTCCCTGCTCCAGACATGAATCAGGTCACTATTCAATG
 MetAsnGlnValThrIleGlnTrp
 121 GGATGCAGTAATAGCCCTTACATACTCTTCAGCTGGTGTATGGAGGAATTACAAATAT
 AspAlaValIleAlaLeuTyrIleLeuPheSerTrpCysHisGlyGlyIleThrAsnIle
 181 AACTGCTCTGCCACATCTGGTAGAACCCAGCCACAATTAAAGATGGGTGTGAATAT
 AsnCysSerGlyHisIleTrpValGluProAlaThrIlePheLysMetGlyValAsnIle
 241 CTCTATATATTGCCAAGCAGCAATTAAAGAACCTGCCAACCAAGGAACTTCATTAA
 SerIleTyrCysGlnAlaAlaIleLysAsnCysGlnProArgLysLeuHisPheTyrLys
 301 AAATGGCATCAAAGAAAAGATTCAAATCACAGGATTAATAAAACAAACAGCTCGGCTTG
 AsnGlyIleLysGluArgPheGlnIleThrArgIleAsnLysThr-ThrAlaArgLeuTrp
 361 GTATAAAAACCTTCTGGAACCACATGCTCTATGTACTGCACTGCTGAATGTCACAA
 TyrLysAsnPheLeuGluProHisAlaSerMetTyrCysThrAlaGluCysProLysHis
 421 TTTCAAGAGACACTGATATGTGGAAAAGACATTCTCTGGATATCCGCCAGATATTCC
 PheGlnGluThrLeuIleCysGlyLysAspIleSerSerGlyTyrProProAspIlePro
 481 TGATGAAGTAAACCTGTCTCATTTATGAATATTCAAGGAACTGACTGCACTGGAAATGC
 AspGluValThrCysValIleTyrGlutYerSerGlyAsnMetThrCysThrTrpAsnAla
 541 TGGGAGGCTCACCTACATAGACACAAAAACGTTGGTACATGTGAAGAGTTAGAGACACA
 GlyArgLeuThrTyrIleAspThrLysTyrValValHisValLysSerLeuGluThrGlu
 601 AGAAGAGCAAAGTATCTCACCTCAAGCTATATTAAACATCTCCACTGATTCAAGG
 GluGluGlnGlnIleThrSerSerTyrIleAsnIleSerThrAspSerLeuGlnGly
 661 TGGCAAGAAGTACTTGGTTGGTCCAAGCAGCAAACGCACTAGGCATCGAACAGACTCAA
 GlyLysLysTyrLeuValTrpValGlnAlaAlaAsnAlaLeuGlyMetGluGluSerLys
 721 ACAACTGCAAATTCAACCTGGATGATAGTGTACTTCTGCAGCCGTCAATTCCAGGGC
 GlnLeuGlnIleHisLeuAspAspIleValIleLeuSerAlaAlaValIleSerArgAla
 781 TGAGACTATAATGCTACAGTGCCCAGACCAATAATTATTGGATAGTCACAAACAACAT
 GluThrIleAsnAlaThrValProLysThrIleIleTyrTrpAspSerGlnThrThrIle
 841 TGAAAAGGTTCTGTGAAATGAGATACAAGGCTACAACAAACAAACCTGGAAATGTTAA
 GluLysValSerCysGluMetArgTyrLysAlaThrThrAsnGlnThrTrpAsnValLys
 901 AGAATTGACACCAATTTCATATGTGCAACAGTCAGAATTCTACTTGGAGCCAAACAT
 GluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSerGluPheTyrLeuGluProAsnIle
 961 TAAGTACGTATTCAGTGAGATGTCAGAACAGGCAAAAGGTACTGGCAGCCTGGAG
 LysTyrValPheGlnValArgCysGlnGluThrGlyLysArgTyrTrpGlnProTrpSer
 1021 TTCACTGTTTTCTATAAAACACCTGAAACAGGTGAGTGTACTTATATATTCTGTT
 SerLeuPhePheHisLysThrProGluThrGlyGluCysThrTyrIlePheTyrSerVal
 1081 TGGGCTTTCTTATATCTTCTGCTGAGCACAGTGGCTCACGCCGTAAATTCCAGC
 GlyLeuPhePheIleTyrLeuPheCys***
 1141 ACTTTGAGAGGCCAAGGCAGGAAGATTGCTTGAGCCTAGGAGTTGAGACTGGCCTGGG
 1201 AACATGGTGAGACCCCTAGTCGTACAGAAAAATAATAATTATTAGCCTGGGTGGTGG
 1261 AATGCATTGTTAGTCGCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGTAGTAGGATTGCGTGAGCCCCGGG
 1321 AGTTTGATGCTGCAGTGAAGCTATGATCATCCACTGCTCTAGCCTGGAGGAAAGACCA
 1381 AGACCCCTGTTCTAAAAAGTTAAAACAGCCAGGTGCACTGGCTTATGTCGTAAATCCC
 1441 AGCACCTTGGGAGGCCAAGGTGGGATTACCTTAGGTCAAGGACTTCAAGACCTCCTCG
 1501 GCGGACATGGTGAACCTGTCTACTAAAATACGAAAATTAGCTGGGCATGGTGGCA
 1561 GGTGCCCTGTAATCTCAGCTACTCGGAAGGCTGAGGCAGGAAAATTGCTTGAACCCAAGAA
 1621 GTGGAGGTTGCAGTGAACGTGAGATTGTACCAACCGCACTCCAGCCTGGCCAAGAGAGAGAG
 1681 ACTTGGCTCAAAAAAAAAAATAAAAATAAAATAATAATAATAAAGTTAAAAACAAAA
 1741 TAAAGCTACAAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 5

1 ATGACACAGCCAACAAGGGTGGCAGCCTGGCTCTGAAGTGGATTATGTGCTTCACACAG
 61 GTTGAAGAGGGAAACAGTCTTTCTGCTTCCAGACATGAATCAGGTCACTATTCAATG
 MetAsnGlnValThrIleGlnTrp
 121 CGATGCAGTAATAGCCCTTACATACTCTTCAGCTGGTGTCAATGGAGGAATTACAAATAT
 AspAlaValIleAlaLeuTyrIleLeuPheSerTrpCysHisGlyGlyIleThrAsnIle
 181 AAACTGCTCTGCCAACATCTGGGTAGAACCGACCACAAATTAAAGATGGGTGTGAATAT
 AsnCysSerGlyHisIleTrpValGluProAlaThrIlePheLysMetGlyValAsnIle
 241 CTCTATATATTGCCAACGAGCAATTAAAGAACTGCCAACCAAGGAAACTTCATTAA
 SerIleTyrCysGlnAlaAlaIleLysAsnCysGlnProArgLysLeuHisPheTyrLys
 301 AAATGGCATCAAAGAAAGATTCAAATCACAGGATTAAATAAAACACAGCTGGCTTG
 AsnGlyIleLysGluArgPheGlnIleThrArgIleAsnLysThrThrAlaArgLeuTrp
 361 GTATAAAAACCTTCTGGAACCACATGCTTCTATGTACTGCACTGCTGAATGTCCCACAA
 TyrLysAsnPheLeuGluProHisAlaSerMetTyrCysThrAlaGluCysProLysHis
 421 TTTTCAAGAGACACTGATATGTGGAAAAGACATTCTCTGGATATCCGCCAGATATTCC
 PheGlnGluThrLeuIleCysGlyLysAspIleSerSerGlyTyrProProAspIlePro
 481 TGATGAAAGTAACCTGTGTCAATTATGAATATTCAAGGAAACATGACTTGCACCTCGAATGC
 AspGluValThr**Cys**ValIleTyrGluTyrSerGlyAsnMetThr**Cys**ThrTrpAsnAla
 541 TCGGAGGCTCACCTACATAGACACAAAAACAGTGGTACATGTGAAGAGTTAGAGACAGA
 GlyArgLeuThrTyrIleAspThrLysTyrValValHisValLysSerLeuGluThrGlu
 601 AGAAGAGCAACAGTATCTCACCTCAAGCTATATTAAACATCTCCACTGATTCAAGG
 GluGluGlnIleTyrLeuThrSerSerTyrIleAsnIleSerThrAspSerLeuGlnGly
 661 TGGCAAGAAGTACTTGGTTGGGTCCAAGCAGCAGCAACGCACTAGGCATGAAAGAGTC
 GlyLysLysTyrLeuValTrpValGlnAlaAlaAsnAlaLeuGlyMetGluGluSerLys
 721 ACAACTGCAAATTCACTGGATGATATACTGACTTCTGCAGCCGTCAATTCCAGGGC
 GlnLeuGlnIleHisLeuAspAspIleValIleLeuSerAlaAlaValIleSerArgAla
 781 TGAGACTATAAAATGCTACAGTCCCCAAGACCATAATTATTGGGATAGTCACAAACAA
 GluThrIleAsnAlaThrValProLysThrIleIleTyrTrpAspSerGlnThrThrIle
 841 TGAAAAGGTTCTGTGAATGAGATACAAGGCTACACAAACAAACTTGGAAATGTTAA
 GluLysValSerCysGluMetArgTyrLysAlaThrAsnGlnThrTrpAsnValLys
 901 AGAATTTGACACCAATTTCACATATGTGCAACAGTCAGAATTCTACTTGGAGCCAAACAT
 GluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSerGluPheTyrLeuGluProAsnIle
 961 TAAGTACGTATTCAAGTGGAGATGTCAAGAACAGGCAAAAGGTACTGGCAGCCTGGAG
 Lys**Tyr**ValPheGlnVal**Arg**CysGlnGluThrGlyLysArg**Tyr**TrpGlnProTrpSer
 1021 TTCACTGTTTTCTATAAAACACCTGAAACAGTTCCCCAGGTCAACATCAAAGCATTCCA
 SerLeuPhePheHisLysThrProGluThrValProGlnValThrSerLysAlaPheGln
 1081 ACATGACACATGGAAATTCTGGGCTAACAGTTGCTTCCATCTACAGGGCACCTTACTTC
 HisAspThrTrpAsnSerGlyLeuThrValAlaSerIleSerThrGlyHisLeuThrSer
 1141 TGACAAACAGAGGAGACATTGGACTTTATTGGGATATTAACAGATCATTCCGAACTGGGATTAAAGAAGGAT
 AspAsnArgGlyAspIleIleIleIleGly**Met****Ile****Arg**Asp**Arg****Arg****Ile**
 1201 AATTCTTCTTGATTGGGATATTAAACAGATCATTCCGAACTGGGATTAAAGAAGGAT
 Ile**Leu****Leu****Ile****Asp****Gly****Ile****Arg****Arg****Arg****Ile**
 1261 CTTATTGTTAACCAAAAGTGGCTTTATGAAGATATTCTAACATATGAAAAACAGCAATGT
 LeuLeuIleProLysTrpLeuTyrGluAspIleProAsnMetLysAsnSerAsnVal
 1321 TGTGAAAATGCTACAGCCAGGTGTGGTGTGCTCTGTGATCCAGCTACTTGGGAAG
 ValLysMetLeuGlnProGlyValValValCysSerCysAspProSerTyrLeuGlySer
 1381 CTGAAGTAGGAGGACTGCTTGAGCCAGGAGTCCAACACCAGCTTCACAACATACCAAGA

 1441 CCCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 6

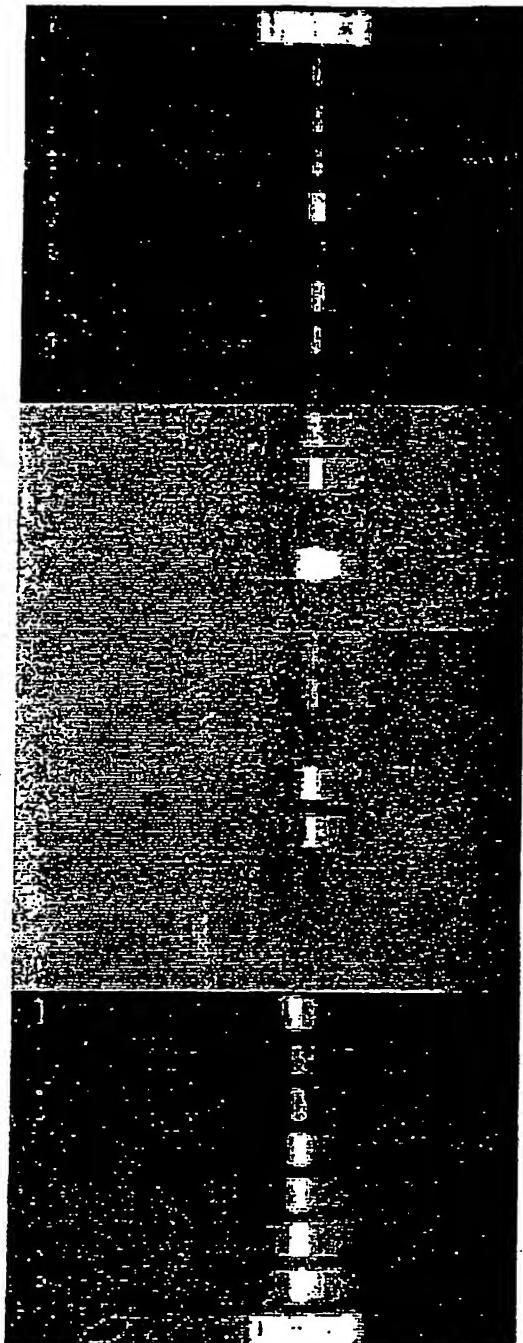
1 ATGACACAGCCAACAAGGGTGGCAGCCTGGCTCTGAAGTGGATTATGTGCTTCAAACAG
 61 GTTGAAAGAGGGAAACAGTCTTCTGCTCCAGACATGAATCAGGTCACTATTCAATG
MetAsnGlnValThrIleGlnTrp
 121 GGATGCAGTAATAGCCCTTACATACTCTTCAGCTGGTGTCTGGAGGAATTACAAATAT
 AspAlaValIleAlaLeuTyrIleLeuPheSerTrpCysHisGlyIleThrAsnIle
 181 AAACTGCTCTGCCACATCTGGTAGAACCCAGCCACAATTAAAGATGGGTGTGAATAT
 AsnCysSerGlyHisIleTrpValGluProAlaThrIlePheLysMetGlyValAsnIle
 241 CTCTATATATTGCCAACGCAATTAAAGAATGCCAACCAAGGAAACTTCATTAA
 SerIleTyrCysGlnAlaAlaIleLysAsnCysGlnProArgIleLeuHisPheTyrLys
 301 AAATGGCATCAAAGAAAAGATTCAAATCACAGGATTAAATAAAACACAGCTGGCTTG
 AsnGlyIleLysGluArgPheGinileThrArgIleAsnLysThrThrAlaArgLeuTrp
 361 GTATAAAACTTTCTGGAACCACATGCTTCTATGTACTGCCTGCTGAATGTCCTAAACA
 TyrLysAsnPheLeuGluProHisAlaSerMetTyrCysThrAlaGluCysProLysHis
 421 TTTTCAAGAGACACTGATATGTGGAAAAGACATTCTCTGGATATCCGCCAGATATTCC
 PheGlnGluThrLeuIleCysGlyLysAspIleSerSerGlyTyrProProAspIlePro
 481 TGATGAAGTAACCTGTGTCAATTGAAATATTCAAGGCAACATGACTGCACCTGGAATGCA
 AspGluValThrCysValIleTyrGluTyrSerGlyAsnMetThrCysThrTrpAsnAla
 541 TGGGAGGCTCACCTACATAGACACAAAAACGTGGTACATGTGAAGAGTTAGAGACAGA
 GlyArgLeuThrTyrIleAspThrLysTyrValValHisValLysSerLeuGluThrGlu
 601 AGAAGAGCAACAGTATCTCACCTCAAGCTATATTAAACATCTCCACTGATTCAATTACAGG
 GluGluGlnGlnTyrLeuThrSerSerTyrIleAsnIleSerThrAspSerLeuGlnGly
 661 TGGCAAGAAGTACTTGGTTGGGTCCAAGCAGCAACGCACTAGGCATGGAAGAGTC
 GlyLysLysTyrLeuValTrpValGlnAlaAlaAsnAlaLeuGlyMetGluGluSerLys
 721 ACAACTGCAAATTCACCTGGATGATATAGTGTACTTCTGCAGCGTCATTCCAGGGC
 GlnLeuGlnIleHisLeuAspAspIleValIleLeuSerAlaAlaValIleSerArgAla
 781 TGAGACTATAAAATGCTACAGTGCCCAAGACCATAATTATTGGGATAGTC
 GluThrIleAsnAlaThrValProLysThrIleIleTyrTrpAspSerGlnThrThrIle
 841 TGAAAAGGTTCTGTGAAATGAGATAACAAGGCTACAACAAACCAAAACTGGAATGTTAA
 GluLysValSerCysGluMetArgTyrLysAlaThrThrAsnGlnThrTrpAsnValLys
 901 AGAATTGACACCAATTTCACATATGTGCAACAGTCAGAATTCTACTTGGAGCCAAACAT
 GluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSerGluPheTyrLeuGluProAsnIle
 961 TAAGTACGTATTCAAGTGAGATGTCAAGAACAGGCAAAAGGTACTGGCAGCCTTGGAG
 LysTyrValPheGlnValArgCysGlnGluThrGlyLysArgTyrTrpGlnProTrpSer
 1021 TTCACTGTTTTCTAAACACTGAAACAGTTCCCAGGTACATCAAAGCATTCCA
 SerLeuPhePheHisLysThrProGluThrValProGlnValThrSerLysAlaPheGln
 1081 ACATGACACATGGAATTCTGGCTAACAGTTGCTTCCATCTCACAGGGCACCTTACTTC
 HisAspThrTrpAsnSerGlyLeuThrValAlaSerIleSerThrGlyHisLeuThrSer

Figure 7

1141 TGACAAACAGAGGAGACATTGGACTTTATTGGGAATGATCGTCTTGCTGTTATGTTGTC
 AspAsnArgGlyAspIleGlyLeuLeuIlePheMetLysAsnIlePheIleValMetLeuSer
 1201 AATTCTTCTTGATTGGACATTAAACAGATCATTCCGAACCTGGATTAAAAGAAGGAT
~~LeuLeuLeuIlePheIlePheIlePheIle~~ ArgSerPheArgThrGlyIleLysArgArgIle
 1261 CTTATTGTTAACCAAAAGTGGCTTATGAAGATATTCTAATATGAAAAACAGCAATGT
 LeuLeuLeuIleProLysTrpLeuTyrGluAspIleProAsnMetLysAsnSerAsnVal
 1321 TGTGAAAATGCTACAGGAAAATAGTGAACCTATGAATAATAATTCCAGTGAGCAGGT CCT
 ValLysMetLeuGlnGluAsnSerGluLeuMetAsnAsnAsnSerSerGluGlnValLeu
 1381 ATATGTTGATCCCAGTACAGAGATAAAAAGAAATCTCATCCCAGAACACAAGCCTAC
 TyrValAspProMetIleThrGluIleLysGluIlePheIleProGluHisLysProThr
 1441 AGACTACAAGAAGGAGAATACAGGACCCCTGGAGACAAGAGACTACCCGAAAACCTCGCT
 AspTyrLysLysGluAsnThrGlyProLeuGluThrArgAspTyrProGlnAsnSerLeu
 1501 ATTGCGACAATACTACAGTTGTATATATTCCCTGATCTAACACTGGATATAAACCCCAAAT
 PheAspAsnThrThrValValTyrIleProAspLeuAsnThrGlyTyrLysProGlnIle
 1561 TTCAAATTTCTGCCTGAGGGAAAGCCATCTCAGTAATAATAATGAAAATTACTTCCTTAAC
 SerAsnPheLeuProGluGlySerHisLeuSerAsnAsnAsnGluIleThrSerLeuThr
 1621 ACTTAAACCACCAAGTTGATTCTTAGACTCAGGAAATAATCCAGGTTACAAAGCATCC
 LeuLysProProValAspSerLeuAspSerGlyAsnAsnProArgLeuGlnLysHisPro
 1681 TAATTITGCTTTCTGTTCAAGTGTGAATTCACTAAAGCAACACAATATTCTGGAGA
 AsnPheAlaPheSerValSerSerValAsnSerLeuSerAsnThrIlePheLeuGlyGlu
 1741 ATTAAGCCTCATATTAATCAAGGAGAATGCAGTTCTCTGACATAACAAACTCAGTAGA
 LeuSerLeuIleLeuAsnGlnGlyGluCysSerSerProAspIleGlnAsnSerValGlu
 1801 GGAGGAAACCACCATGCTTTGGAAAATGATTCAACCCAGTGAAACTATTCCAGAACAGAC
 GluGluThrThrMetLeuLeuGluAsnAspSerProSerGluThrIleProGluGlnThr
 1861 CCTGCTTCCCTGATGAATTGTCTCCTGTTGGGGATCGTGAATGAGGAGTTGCCATCTAT
 LeuLeuProAspGluPheValSerCysLeuGlyIleValAsnGluGluLeuProSerIle
 1921 TAATACTTATTTCCACAAAATATTTGGAAAGCCACTCAATAGGATTCACTCTTGA
 AsnThrTyrPheProGlnAsnIleLeuGluSerHisPheAsnArgIleSerLeuLeuGlu
 1981 AAAGTAGAGCTGTGTGGTCAAAATCAATATGAGAAAGCTGCCTTGCATCTGAACATTGGG
 Lys***
 2041 TTTTCCCTGCAATAGAAAATTGAATTCTGCCTCTTTGAAAAAAATGTATTCACATCCCA
 2101 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

8 / 14

Figure 8

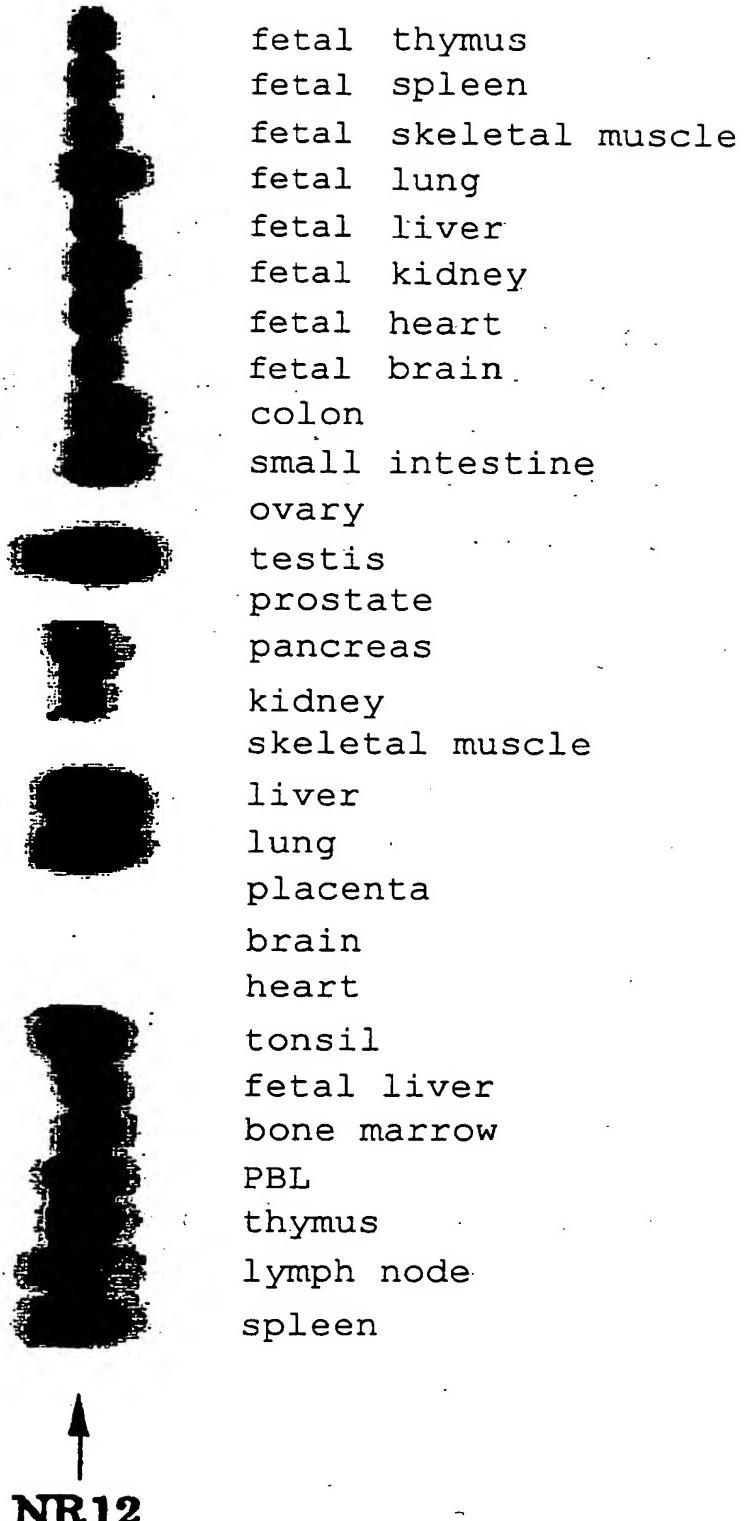


fetal thymus
fetal spleen
fetal skeletal muscle
fetal lung
fetal liver
fetal kidney
fetal heart
fetal brain
colon
small intestine
ovary
testis
prostate
pancreas
kidney
skeletal muscle
liver
lung
placenta
brain
heart
tonsil
fetal liver
bone marrow
PBL
thymus
lymph node
spleen

NR12

9 / 14

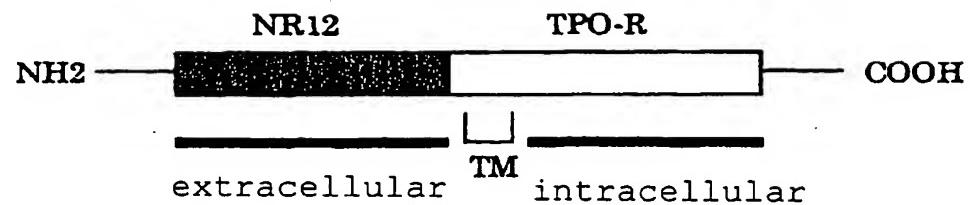
Figure 9



10 / 14

Figure 10

pME18S/NR12-TPOR



pCHO/NR12-FLAG

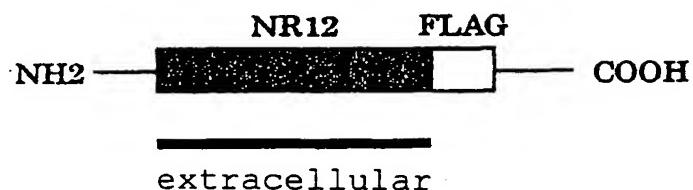


Figure 11

1 ATGAAATCAGGTCACTATTCAATGGGATGCAGTAATGCCCTTACATACTCTTCAGCTGG
METAsnGlnValThrIleGlnTrpAspAlaValIleAlaLeuTyrIleLeuPheSerTrp
 61 TGTCACTGGAGGAATTACAAATATAAACTGCTCTGGCCACATCTGGGTAGAACCGAGCCACA
CysHisGlyGlyIleThrAsnIleAsnCysSerGlyHisIleTrpValGluProAlaThr
 121 ATTTTTAAGATGGGTATGAATATCTCTATATATTGCCAACAGCAATTAAAGAACTGCCAA
IlePheLysMETGlyMETAsnIleSerIleTyrCysGlnAlaAlaIleLysAsnCysGln
 181 CCAAGGAAACTTCATTTTATAAAAATGGCATCAAAGAAAAGATTCAAATCACAGGATT
ProArgLysLeuHisPheTyrLysAsnGlyIleLysGluArgPheGlnIleThrArgIle
 241 AATAAAACACAGCTGGCTTGGTATAAAACTTCTGGAACCACATGCTCTATGTAC
AsnLysThrThrAlaArgLeuTrpTyrLysAsnPheLeuGluProHisAlaSerMETTyr
 301 TGCACTGCTGAATGTCCAAACATTTCAGAGACACTGATATGTGGAAAAGACATTCT
CysThrAlaGluCysProLysHisPheGlnGluThrLeuIleCysGlyLysAspIleSer
 361 TCTGGATATCCGCCAGATATTCCCTGATGAAGTAACCTGTGTCATTATGAAATTTCAGGC
SerGlyTyrProProAspIleProAspGluValThrCysValIleTyrGluTyrSerGly
 421 AACATGACTTGCACCTGGAATGCTGGAAAGCTCACCTACATAGACACAAAATACGTGGTA
AsnMETThrCysThrTrpAsnAlaGlyLysLeuThrTyrIleAspThrLysTyrValVal
 481 CATGTGAAGAGTTAGAGACAGAAGAAGAGCAACAGTATCTCACCTCAAGCTATATTAAC
HisValLysSerLeuGluThrGluGlnGluGlnTyrLeuThrSerSerTyrIleAsn
 541 ATCTCCACTGATTCAAGGTGGCAAGAAGTACTTGGTTGGGTCCAAGCAGCAAAC
IleSerThrAspSerLeuGlnGlyGlyLysLysTyrLeuValTrpValGlnAlaAlaAsn
 601 GCACTAGGCATGGAAGAGTCAAAACAACCTGCAAAATTCACCTGGATGATATACTGATAACCT
AlaLeuGlyMETGluGluSerLysGlnLeuGlnIleHisLeuAspAspIleValIlePro
 661 TCTGCAGCCGTCAATTCCAGGGCTGAGACTATAAAATGCTACAGTGCCAAGACCATAATT
SerAlaAlaValIleSerArgAlaGluThrIleAsnAlaThrValProLysThrIleIle
 721 TATTGGGATAGTCAAAACAATTGAAAAGGTTCTGTGAAATGAGATAACAGGCTACA
TyrTrpAspSerGlnThrThrIleGluLysValSerCysGluMETArgTyrLysAlaThr
 781 ACAAAACAAACTTGGAAATGTTAAAGAATTGACACCAATTTCACATATGTGCAACAGTC
ThrAsnGlnThrTrpAsnValLysGluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSer
 841 GAATTCTACTTGGAGCCAAACATTAAAGTACGTATTCAAGTGAGATGTCAAGAAACAGGC
GluPheTyrLeuGluProAsnIleLysTyrValPheGlnValArgCysGlnGluThrGly
 901 AAAAGGTACTGGCAGCCTGGAGTTCACTGTTTTCATAAAACACCTGAAACAGTTCCC
LysArgTyrTrpGlnProTrpSerSerLeuPhePheHisLysThrProGluThrValPro
 961 CAGGTACACATCAAAAGCATTCCAACATGACACATGGAATTCTGGCTAACAGTTGCTTCC
GlnValThrSerLysAlaPheGlnHisAspThrTrpAsnSerGlyLeuThrValAlaSer
 1021 ATCTCTACAGGGCACCTACTTCTGACAAACAGAGGAGACATTGGACTTTATTGGAAATG
IleSerThrGlyHisLeuThrSerAspAsnArgGlyAspIleGlyLeuLeuGlyMetX

Figure 12

1081 ATCGTCTTGCTGTTATGTTGTCAATTCTTCCTTGATTGGGATATTAAACAGATCATTC
IleValPheLeuIleValMETLeuSerIleLeuSerIleLeuIleGlyIlePheAsnArgSerPhe
1141 CGAACTGGGATTAAAAGAAGGATCTTATTGTTAACCAAAGTGGCTTTATGAAGATATT
ArgThrGlyIleLysArgArgIleLeuLeuLeuIleProLysTrpLeuTyrGluAspIle
1201 CCTAATATGAAAAACAGCAATGTTGTGAAATGCTACAGCCAGGTGTGGTGGTGTGCTCC
ProAsnMETLysAsnSerAsnValValLysMETLeuGlnProGlyValValValCysSer
1261 TGTGATCCCAGCTACTTGGGAAGCTGAAGTAGGAGGACTGC
CysAspProSerTyrLeuGlySer***

Figure 13

1 ATGAATCAGGTCACTATTCAATGGGATGCAGTAATGCCCTTACATACTCTTCAGCTGG
METAsnGlnValThrIleGlnTrpAspAlaValIleAlaLeuTyrIleLeuPheSerTrp
 61 TGTCACTGGAGGAATTACAATATAAACTGCTCTGGCCACATCTGGGTAGAACCGACCACA
CysHisGlyGlyIleThrAsnIleAsnCysSerGlyHisIleTrpValGluProAlaThr
 121 ATTTTTAAGATGGGTATGAATATCTCTATATATTGCCAACGAGCAATTAAAGAACTGCCAA
IlePheLysMETGlyMETAsnIleSerIleTyrCysGinAlaAlaIleLysAsnCysGln
 181 CCAAGGAAACTTCATTTTATAAAAATGGCATCAAAGAAAGATTCAAATCACAGGATT
ProArgLysLeuHisPheTyrLysAsnGlyIleLysGluArgPheGlnIleThrArgIle
 241 AAAATAACACAGCTCGGCTTGGTATAAAACTTTCTGGAACCACATGCTTCTATGTAC
AsnLysThrThrAlaArgLeuTrpTyrLysAsnPheLeuGluProHisAlaSerMETTyr
 301 TGCAC TGCTGAATGTCCCCAACATTTCAGAGAGACACTGATATGTGGAAAAGACATTCT
CysThrAlaGluCysProLysHisPheGlnGluThrLeuIleCysGlyLysAspIleSer
 361 TCTGGATATCCGCAGATATTCTGATGAAGTAACTGTGTCAATTGAAATATTCAAGGC
SerGlyTyrProProAspIleProAspGluValThrCysValIleTyrGluTyrSerGly
 421 AACATGACTTGACCTGGAATGCTGGGAAGCTCACCTACATAGACACAAAAATCGTGGTA
AsnMETThrCysThrTrpAsnAlaGlyLysLeuThrTyrIleAspThrLysTyrValVal
 481 CATGTGAAGAGTTAGAGACAGAAGAGCAACAGTATCTCACCTCAAGCTATATTAAC
HisValLysSerLeuGluThrGluGluGlnGlnTyrLeuThrSerSerTyrIleAsn
 541 ATCTCCACTGATTCAATTACAAGGTGGCAAGAAGTACTTGGTTGGGTCCAAGCAGCAAAC
IleSerThrAspSerLeuGlnGlyGlyLysTyrLeuValTrpValGlnAlaAlaAsn
 601 GCACTAGGCATGGAAGAGTCACAAACTGCAAAATTCACCTGGATGATATAGTGTACCT
AlaLeuGlyMETGluGluSerLysGlnLeuGlnIleHisLeuAspAspIleValIlePro
 661 TCTGCAGCCGTCAATTCCAGGGCTGAGACTATAAAATGCTACAGTGCCCAAGACCATAATT
SerAlaAlaValIleSerArgAlaGluThrIleAsnAlaThrValProLysThrIleIle
 721 TATTGGGATAGTCACAAACAATTGAAAAGGTTCTGTGAAATGAGATAACAGGCTACA
TyrTrpAspSerGlnThrThrIleGluLysValSerCysGluMETArgTyrLysAlaThr
 781 ACAAAACAAACTTGGAAATGTTAAAGAATTGACACCAATTTCATATGTGCAACAGTCA
ThrAsnGlnThrTrpAsnValLysGluPheAspThrAsnPheThrTyrValGlnGlnSer
 841 GAATTCTACTTGGAGCCAAACATTAAAGTACGTATTCAAGTGAGATGTCAAGAACAGGC
GluPheTyrLeuGluProAsnIleLysTyrValPheGlnValArgCysGlnGluThrGly
 901 AAAAGGTACTGGCAGCCTGGAGTTCACTGTTTTCAAAACACCTGAAACAGTTCCC
LysArgTyrTrpGlnProTrpSerSerLeuPhePheHisLysThrProGluThrValPro
 961 CAGGTACATCAAAAGCATTCCAACATGACACATGGAATTCTGGGCTACAGTTGCTTCC
GlnValThrSerLysAlaPheGlnHisAspThrTrpAsnSerGlyLeuThrValAlaSer
 1021 ATCTCTACAGGGCACCTTACTCTGACAAACAGAGGAGACATTGGACTTTATTGGGAATG
IleS rThrGlyHisLeuThrSerAspAsnArgGlyAspSerGlyLeuLeuLeuGlyLeu

Figure 14

1081 ATCGTCTTGCTGTTATGTTGTCAATTCTTCAGGGATATTAAACAGATCATT
~~136VcPheAlaValMetLeuSerIleLeuSerLeuIleGlyIlePheAsnArgSerPhe~~
 1141 CGAACGGATTAAAAGAAGGATCTTATTGTTAACCAAGTGGCTTATGAAGATATT
 ArgThrGlyIleLysArgArgIleLeuLeuLeuIleProLysTrpLeuTyrGluAspIle
 1201 CCTAATATGAAAAACAGCAATGTTGTGAAATGCTACAGGAAAATAGTGAACATTATGAAT
 ProAsnMETLysAsnSerAsnValValLysMETLeuGlnGluAsnSerGluLeuMETAsn
 1261 AATAATTCCAGTGAGCAGGCCTATATGTTGATCCCATGATTACAGAGATAAAAGAAATC
 AsnAsnSerSerCluGlnValLeuTyrValAspProMETIleThrGluIleLysGluIle
 1321 TTCATCCCAGAACACAAGCCTACAGACTACAAGAAGGAGAACAGGACCCCTGGAGACA
 PheIleProGluHisLysProThrAspTyrLysGluAsnThrGlyProLeuGluThr
 1381 AGAGACTACCCGAAACACTCGCTATTGACAATACTACAGTTGTATATATTCCCTGATCTC
 ArgAspTyrProGlnAsnSerLeuPheAspAsnThrThrValValTyrIleProAspLeu
 1441 AACACTGGATATAACCCCAAATTCAAATTTCTGCCTGAGGGAAGCCATCTCAGTAAT
 AsnThrGlyTyrLysProGlnIleSerAsnPheLeuProGluGlySerHisLeuSerAsn
 1501 AATAATGAAATTACTTCCTAACACTAAACCACCAAGTTGATTCCCTAGACTCAGGAAAT
 AsnAsnGluIleThrSerLeuThrLeuLysProProValAspSerLeuAspSerGlyAsn
 1561 AATCCCAGGTTACAAAGCATCTAATTTGCTTTCTGTTCAAGTGTGAATTCACTA
 AsnProArgLeuGlnLysHisProAsnPheAlaPheSerValSerValAsnSerLeu
 1621 AGCAACACAATATTCTTGGAGAATTAAGCCTCATATTAAATCAAGGAGAATGCAGTTCT
 SerAsnThrIlePheLeuGlyGluLeuSerLeuIleLeuAsnGlnGlyGluCysSerSer
 1681 CCTGACATACAAACTCAGTAGAGGAGGAAACCACCATGCTTTGGAAAATGATTCAACCC
 ProAspIleGlnAsnSerValGluGluGluThrThrMETLeuLeuGluAsnAspSerPro
 1741 AGTGAAACTATTCCAGAACAGACCCCTGCTCCTGATGAATTGTCCTGTTGGGGATC
 SerGluThrIleProGluGlnThrLeuLeuProAspGluPheValSerCysLeuGlyIle
 1801 GTGAATGAGGAGTTGCCATCTATTAAACTTATTCCACAAAATATTGGAAAGCCAC
 ValAsnGluGluLeuProSerIleAsnThrTyrPheProGlnAsnIleLeuGluSerHis
 1861 TTCAATAGGATTTCACTCTTGGAAAAGTAGAGCTGTGTGGTCAAAATCAA
 PheAsnArgIleSerLeuLeuGluLys***